

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 8 月 14 日 (14.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/066856 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 5/10 (74) 代理人: 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/01260
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-30003 2002 年 2 月 6 日 (06.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サンバイオ、インコーポレイティド (SANBIO, INC.) [US/US]; 94041-1522 カリフォルニア州 マウンテンビュー、サウスウィズマンロード231、スイートエー CA (US).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 出澤 真理 (DEZAWA, Mari) [JP/JP]; 〒237-0066 神奈川県 横須賀市 湘南鷹取 5-45-J-202 Kanagawa (JP). 澤田 元 (SAWADA, Hajime) [JP/JP]; 〒221-0844 神奈川県 横浜市 神奈川区 沢渡 21-20-404 Kanagawa (JP). 菅野 洋 (KANNO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒232-0072 神奈川県 横浜市 南区 永田東 2-7-8 Kanagawa (JP). 高野 雅彦 (TAKANO, Masahiko) [JP/JP]; 〒227-0036 神奈川県 横浜市 青葉区 奈良町 2864-3-3-702 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DIFFERENTIATING/INDUCING BONE MARROW INTERSTITIAL CELLS INTO NERVE CELLS AND SKELETON MUSCLE CELLS BY TRANSFERRING Notch GENE

(54) 発明の名称: Notch 遺伝子の導入により骨髄間質細胞を神経細胞及び骨格筋細胞に分化・誘導する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of differentiating/inducing bone marrow interstitial cells into nerve cells and skeleton muscle cells by transferring a Notch gene. Namely, a method of differentiating/inducing bone marrow interstitial cells into nerve cells or skeleton muscle cells *in vitro* which comprises transferring a Notch gene and/or a Notch signaling-associated gene into the above cells, wherein the differentiated/induced cells finally produced are obtained as the results of the cell division of the bone marrow interstitial cells having the Notch gene and/or the Notch signaling-associated gene transferred therein. It is also intended to provide a method of further differentiating/inducing the differentiated/induced cells as described above into dopaminergic neurons and acetylcholinergic neurons. Moreover, it is intended to provide a method of treating a neurodegenerative or myodegenerative disease using the nerve precursor cells, nerve cells or skeleton muscle cells produced by the above methods.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/066856 A1

WO 03/066856 A1

(57) 要約:

N o t c h 遺伝子の導入を用いて骨髄間質細胞を神経細胞及び骨格筋細胞に分化・誘導する方法の提供。本発明は、骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、上記細胞内にN o t c h 遺伝子及び／又はN o t c h シグナリング関連遺伝子を導入することを含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のN o t c h 遺伝子及び／又はN o t c h シグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法を提供する。本発明は、上記分化・誘導された神経細胞を、ドーパミン作動性ニューロン、及びアセチルコリン作動性ニューロンにさらに分化・誘導する方法をも提供する。本発明は、本発明に係る方法により製造された神経前駆細胞、神経細胞又は骨格筋細胞を使用した神経又は筋肉変性疾患の治療方法をも提供する。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

明 細 書

N o t c h 遺伝子の導入により骨髄間質細胞を神経細胞及び骨格筋細胞に分化・誘導する方法

技術分野

本発明は、N o t c h 遺伝子の導入により骨髄間質細胞を神経前駆細胞、神経細胞、特にドーパミン作動性ニューロン、又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法、これにより得られた神経前駆細胞、神経細胞又は骨格筋細胞、並びに、これら細胞の治療的使用及び治療方法に関する。

背景技術

アルツハイマー病、パーキンソン病、A L S（筋萎縮性側索硬化症）などの、病状の進行した神経変性疾患を対象にする場合、細胞死によって失われた神経細胞そのものを補充しなくては神経機能再建が実現しない。神経細胞移植に対して動物実験レベルで試みられているとしては胎児及び成体由来の神経幹細胞、ES細胞又は胎児由来の神経細胞などである。しかしながら、いずれもヒトへの応用において大きなハードルがある。胎児由来の幹細胞又は神経細胞の使用に対しては倫理的な問題があり、安定した供給性が得られるか不安がある。またE S細胞はその多分化能という点において現在多くの注目を集めているが、やはり倫理問題を大きく含み、特定の細胞への分化・誘導に対して費用と労力がかかること、さらに移植後奇形腫を形成する危険性があることなども不安定要素として挙げられる。また成体由来の神経幹細胞を用いる場合、中枢神経系の極く限られた中心部分に存在するため開頭して採取しなくてはならず、再

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

生治療と引き換えに受ける患者の危険と負担は多大なものである。

インビトロで中枢神経系幹細胞が分離されてから約10年程たつが、今のところ一般に受け入れられたプロトコルでは、神経幹細胞を分化させ、機能しうるドーパミン作動性又はコリン作動性ニューロンを大量に得ることはできていない (L o r e n z S t u d e r , n a t u r e b i o t e c h n o l o g y 12月号P. 1117 (2001))。

また、カルガリー大学 (C a l g a r y、カナダ) のワイス・サミュエル、新郷哲郎教授らの研究グループは、複数のチロシン水酸化酵素誘導因子の混合液 (T Hカクテル) をマウス脳内に投与し、ドーパミン産生神経細胞を高効率で分化・誘導することに成功しているようであるが、本願発明におけるように骨髄間質細胞からドーパミン作動性ニューロン及びコリン作動性ニューロンを分化・誘導した例は全くない。

運動性ニューロンは、アセチルコリン作動性であり、この細胞はA L S (筋萎縮性側索硬化症) という難病への適用が考えられる。A L Sは何らかの理由で脊髄の運動性ニューロンが細胞死に陥り、筋肉を動かす神経が無くなるために呼吸筋にいたるまで全身の筋肉を動かすことができなくなり発病2～3年で死亡に至る疾患である。現在有効な治療法は無いが、ラットにおいてA L Sモデル動物が作成されつつある。

筋ジストロフィーなどの変性性筋肉疾患の多くは進行性であり、やはり骨格筋細胞の移植が解決となりうる。正常人においては筋組織に存在する衛星細胞 (s a t e l l i t e c e l l) が再生能力を持ち失われた骨格筋の補充に働くが、進行性の筋疾患の場合、細胞数も減少しており再生能力も低くなっている。したがって骨格筋又はその前駆細胞の移植が治療となり得るが現在有効な手段は存

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

在しない。

脳神経系の発生過程では、比較的均一な神経前駆細胞又は神経幹細胞 (neural stem cell) から、ニューロンやグリア細胞が分化・誘導される。前駆細胞群の一部の細胞は分化シグナルに反応してさるサブタイプの細胞に分化するが、残りの細胞は未分化のままで留まる機構が存在している。つまり、先に分化した細胞が周りにあるシグナルを出して自分と同じ細胞に分化するのを防ぐメカニズムが存在する。これを側方制御 (lateral inhibition) という。ショウジョウバエでは先に神経に分化した細胞が Delta というリガンドを発現し、その周りの細胞が Delta の受容体である Notch を発現し、それらは神経細胞にならない (Notch シグナリング)。この Delta-Notch 系は、脊椎細胞においても働いているようである (例えば、Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Kintner, C.: Nature, 375, 761-766 (1995) を参照のこと)。

このように均一なものから多様なものを生み出す発生過程においては、膜タンパク質 Notch を介した細胞間相互作用が重要な役割を担っていること、すなわち、Notch は隣接細胞からリガンド刺激を受けると、Mash1、Math1、ニューロゲニン (Neurogenin) に代表される bHLH (basic helix-loop-helix) 型神経分化因子を阻害する HES1 や HES5 の発現を誘導することにより隣接細胞と同じ種類の細胞への分化を抑制すると考えられている (例えば、影山ら、細胞工学 Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999) を参照のこと)。

Notch の細胞内経路は以下のように考えられている。Notch は、まず隣接細胞の表面に存在するリガンド (Delta, Serrate, Jagged) によって活性化されるとその細胞内

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

ドメインが切り出される (Artavanis-Tsakonas S, et al: Science (1999) 284: 770-776、及び影山ら、細胞工学Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)を参照のこと)。N o t c hの細胞内ドメインが切り出された後、核移行シグナル (N L S) によって細胞膜から核に移行して核内でR B P - J κ というDNA結合タンパク質と複合体を形成する (Honjo T: Genes Cells (1996) 1: 1-9、及び影山ら、細胞工学Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)を参照のこと)。R B P - J κ そのものは、DNAに結合して転写を抑制するレプレッサーで、N o t c hが不活性のときには分化抑制因子であるH E S 1遺伝子のプロモーターに結合してその発現を制御しているが、R B P - J κ とN o t c hの細胞内ドメインが複合体を形成すると、この複合体が逆にH E S 1遺伝子の転写を活性化する (jarriault S, et al: Nature (1995) 377: 355-358、Kageyama R, et al: Curr Opin Genet Dev (1997) 7: 659-665、及び影山ら、細胞工学Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)を参照のこと)。その結果、H E S 1の発現が誘導され、さらにH E S 1により分化が抑制される。すなわち、N o t c hはH E S 1を介して分化を抑制していると考えられている (影山ら、細胞工学Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)を参照のこと)。

哺乳動物においても、神経前駆細胞又は神経幹細胞の維持や多様性に富んだニューロンの分化過程に、N o t c hを介した遺伝子発現制御が重要であること、また、N o t c h経路は神経系以外の細胞分化にも必須であることがわかってきている (Tomita K, et al: Genes Dev (1999) 13: 1203-1210、及び影山ら、細胞工学Vol.18, No.9, 1301-1306 (1999)を参照のこと)。さらに、H E Sが関わらないN o t c h経路の存在、N o t c hシグナリングの転写レベルでの負の調節、タンパク質レベルでの負の相互作用の存在なども予

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

想されている（郷 正博、細胞工学Vol.18, No.9, 1291-1300 (1999)を参照のこと）。しかしながら、上記いずれの文献も、Notchシグナリングは分化を抑制する方向に働くということを示唆・教示している。

再建が不可能とされている中枢神経疾患は、外傷による脊髄損傷や脳血管障害、失明に至る緑内障からパーキンソン氏病などの変性疾患まで実に多種多様の疾患が含まれ、罹患人口は多いものと思われる。従ってこれらの疾患に対する神経再生法の研究は社会的急務であり、我々の研究結果は実際の人への応用の突破になるものと思われる。骨髄間質細胞であれば骨髄穿刺によって病院の外来レベルでの採取が容易であり、非常に旺盛な増殖能を持つので大量培養が比較的短い時間で可能である。さらに自分の骨髄間質細胞から神経が作成できれば自家移植が可能であり、これは大変大きな利点であると思われる。免疫拒絶反応が起きないので免疫抑制剤の投与が不必要であり、安全な治療を与えることが可能と思われる。また、骨髄バンクからも骨髄間質細胞を得ることが可能であるため、供給面からは現実的な対応が可能である。これらの細胞を用いて現在有効な手段のない神経細胞を誘導することができれば再生医学において大きな効果が期待される。

また、ALS（筋萎縮性側索硬化症）は何らかの理由で脊髄の運動ニューロンが細胞死に陥り、筋肉を動かす神経が無くなるために呼吸筋にいたるまで全身の筋肉を動かすことができなくなり発病2～3年で死に至る疾患であるが、現在有効な治療法は無い。自分の骨髄間質細胞からアセチルコリン作動性ニューロンを作成することができれば自家移植が可能であり、これは大変大きな利点であり、ALSの治療法となるかもしれない。

また、筋疾患、とくに骨格筋の変性疾患である筋ジストロフィー

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

などに対しては現時点では有効な治療手段が無い。自分の骨髄間質細胞から骨格筋細胞を作成することができれば自家移植が可能であり、これは大変大きな利点であると思われる。これらの細胞を用いて現在有効な手段のない骨格筋細胞を誘導することができれば再生医学において大きな効果が期待できる。

上記の臨床治療の面だけではなく、今後開発が予想される人工臓器などの工学的な方面においても応用が考えられる。培養レベルで神経細胞や筋肉細胞が容易に作成できることから、ハイブリッド型の人工臓器などの作成において使用も考えられる。

発明の簡単な説明

本発明は、骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、上記細胞内にN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入することを含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法を提供する。さらに、本発明に係る方法により製造された神経前駆細胞、神経細胞、又は骨格筋細胞を使用した神経又は骨格筋変性疾患の新規治療法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、図面に代わる顕微鏡写真（位相差顕微鏡像）である。

図2は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、MAP-2抗体、neurofilament抗体、及びnestin抗体に対する陽性反応を示す、図面に代わる免疫蛍光写真である。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

図 3 は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、神経伝達物質及びその合成酵素である Tyrosine-hydroxylase (TH)、Vesicular acetylcholine transporter (VAChT)、Neuropeptide Y (NPY)、Substance P (SP)、Glutamine (Glu)、Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)、Vasoactive intestinal peptide (VIP) の抗体に対する反応を示す、図面に代わる免疫蛍光写真である。

図 4 は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、GDNF 添加処理前後の、チロシン・ヒドロキシラーゼ陽性率（ドーパミン作動性ニューロン分化・誘導率）の変化を示す図面に代わる免疫蛍光写真である。

図 5 は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、GDNF 添加処理前後の、チロシン・ヒドロキシラーゼ陽性率（ドーパミン作動性ニューロン分化・誘導率）の変化を示すグラフである。

図 6 は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、Neurotrophin (NTs ; 2.5 S NGF) 添加処理前後の、Vesicular Acetylcholine Transporter 陽性率（アセチルコリン作動性ニューロン分化・誘導率）の変化を示す図面に代わる免疫蛍光写真である。

図 7 は、本願発明に従って分化・誘導された神経細胞の、Neurotrophin (NTs ; 2.5 S NGF) 添加処理前後の、Vesicular Acetylcholine Transporter 陽性率（アセチルコリン作動性ニューロン分化・誘導率）の変化を示すグラフである。

図 8 は、本願発明に従って分化・誘導された骨格筋細胞の、図面

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

に代わる顕微鏡写真（位相差顕微鏡像）である。

図 9 は、本願発明に従って分化・誘導された骨格筋細胞の、図面に代わる顕微鏡写真（位相差顕微鏡像）である。図 8 に示す骨格筋が経時的に増加したことを示す。

図 10 は、本願発明に従って分化・誘導された骨格筋細胞が多核であることを示す、図面に代わる共焦点レーザー顕微鏡写真顕写真を示す。核は緑色で示され、そしてアクチン線維は赤色で示される。

図 11 は、ラットのパーキンソン病モデルを用いた、本願発明に係る分化・誘導方法により得られたドーパミン作動性ニューロンの、線状体への移植による治療効果を示すグラフである。

図 12 は、線状体に移植された細胞が、グリア細胞ではなく、神経細胞、及びドーパミン作動性ニューロンであることを示す、図面に代わる免疫蛍光写真である。

図 13 は、線状体に移植された細胞が、神経細胞、及びドーパミン作動性ニューロンであることを示す、図面に代わる拡大された免疫蛍光写真である。

図 14 a ~ f は、単離された骨髄間質細胞（MSC）の特徴を表す。図 14 a は、ラット（MSC）の FACS 分析結果を示す。細胞は、CD29（*beta1-integrin*）、CD90（*Thy-1*）、及び CD54（*ICAM*）を発現したが、CD34（造血幹細胞マーカー）、及び CD116/c（マクロファージに関するマーカー）を発現しなかった。図 14 b, c は、非処理ラット MSC（b）と非処理ヒト MSC（c）の位相差顕微鏡写真である。図 14 d ~ f は、ヒト MSC の CD29（d）、CD90（e）、及び CD34（f）の免疫組織化学的写真である。MSC は、CD29 と CD90 に関して陽性であったが、CD34 に関しては陰

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

性であった。バーは、 $50\mu\text{m}$ を表す。

図15a～hは、NICD (Notch intracellular domain) トランスフェクション後の表現型を表す。図15aは、NICDトランスフェクション前（レーン）とNICDトランスフェクション後（レーン2）の、ラットMSCにおけるNotch extracellular domain (ECD) とintracellular domain (ICD) のRT-PCRの結果である。ECDは非処理MSCにおいて検出されるので、少量の生来の内因性Notchが発現されている。しかしながら、NICDトランスフェクション後、ECDはダウナーレギュレートされ、そしてNICDは僅かにアップレギュレートされた。図15b～gは、非処理（b, d, f）ラットMSC、及びNICDトランスフェクト（c, e, g）ラットMSCにおける、GLAST（b, c）、3-PGDH（d, e）、及びnestin（f, g）に関する免疫組織化学写真である。バーは、b, c, d, gにおいて $50\mu\text{m}$ であり、e, fにおいて $80\mu\text{m}$ である。図15hは、非処理ラットMSC（MSC）、及びNICDトランスフェクトMSC（NICD）における3-PGDHのプロモーター活性を表すグラフである。3-PGDHの全長形と切断（M1965）形の両者が、NICDのトランスフェクション後のプロモーター活性における9～10倍の上昇を示した（ $p < 0.01$ ）。

図16は、各種栄養因子処理におけるMAP-2ab⁺細胞への変換割合を表す。栄養因子導入が非処理又は対照ベクターでトランスフェクトされたラットMSCにおいて行われたとき、MAP-2ab⁺細胞は、検出されなかった。3つの栄養因子（FSK+6FGF+CNTF）の導入は、96.5%の最高割合の神経細胞の製造を示した。一方、上記3つの栄養因子のいずれかの除去は、より低い変換割合をもたらした。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

図17 a～qは、誘導された神経細胞の分析結果を示す。図17 a～cは、ラットMSC (a, b)、及びヒトMSC (c) から誘導された神経細胞の位相差顕微鏡写真である。バーは、aにおいて200 μ mであり、b, cにおいて50 μ mである。図17 d～gとi～kは、栄養因子導入後の(5日目の)ラットMSC (f, g, i, j, k) MSC、及びヒトMSC (d, e) におけるニューロン・マーカー及びグリア・マーカーの免疫組織化学写真である。MAP-2ab (d) とneurofilament-M (e) のニューロン・マーカーがヒトMSCにおいて検出され、そして β 3-tubulin (f) とTuJ-1 (g) がラットMSCにおいて発現された。グリア・マーカーGFAP (i)、GalC (j) とO4 (k) に対して、ラットとヒトのいずれの細胞も反応しなかった。バーは、d, e, fにおいて100 μ mであり、gにおいて60 μ mであり、i-kにおいて100 μ mである。図17 hは、神経細胞のBrd-Uラベリングを表す。MAP-2ab陽性細胞(Alexa Fluor 488標識、緑色コード)は、Brd-U (Alexa Fluor 546標識、赤色コード)を取り込まなかった。図17 lは、MAP-2ab (1) ラット・サンプルとGFAP (2) ラット・サンプルのウェスタン・プロット分析結果を示す。レーン1はウェスタン・プロッティングであり、そしてレーン2はボンソーS (ponceau S) 染色である。非処理MSC (M) はMAP-2abとGFAPのいずれも発現しなかった。栄養因子導入後5日目には(N)、MSCはMAP-2ab陽性になったが、GFAPは陰性のままであった。脳(B)は、MAP-2abとGFAPの両者についてのポジティブ・コントロールである。図17 m～qは、ラットMSCから誘導された神経細胞(m)、及びヒトMSCから誘導された神経細胞(n, p)のパッ

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

チ・クランプ試験結果である。非処理MSC(o, p)に比較して、誘導によりラットMSC(m)、及びヒトMSC(n)において、それぞれ、約1600pAと400pAまで、直流 k^+ 電流が劇的に増加した。(n)において記録したヒトMSCの位相差顕微鏡写真を図17qに示す。

図18は、非処理ラットMSC(MSC)、NICDトランスフェクト・ラットMSC(NICD)、及び神経誘導ラットMSC(誘導)におけるNeuro DとGFAPの比プロモーター活性を示すグラフである。

図19a~mは、パーキンソン病ラット・モデルへの移植結果を示す。図19aは、ラットMSCにおける栄養因子の誘導後の以下の神経伝達物質のパーセンテージを示すグラフである： γ アミノ酪酸(GABA)； 0.3 ± 0.1 、血管作用性小腸ペプチド(VIP)； 0.5 ± 0.1 、セロトニン(Ser)； 2.0 ± 0.4 、グルタメート(Glu)； 2.3 ± 0.7 、サブスタンスP(SP)； 2.4 ± 0.9 、TH； 3.9 ± 0.6 、小胞アセチルコリン・トランスポーター(VAChT)； 5.2 ± 2.4 、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)； 5.3 ± 0.8 、ニューロペプチドY(NPY)； 6.1 ± 1.6 。GDNFのその後の投与によりTH陽性細胞のパーセンテージは(41.0 ± 14.1)まで劇的に上昇した(G-TH)。図19b, cは、栄養因子の導入後、さらにGDNF処理後の、ヒトMSCにおけるTH発現を示す。ヒトMSCは、ヒトMSCは、ラットMSCと同様の応答を示した。TH陽性細胞は、GDNF処理後に明らかに増加した。バーは、bにおいて $100 \mu m$ であり、cにおいて $30 \mu m$ である。図19dは、ラットMSCにおけるNurr-1のRT-PCRの結果を示す。栄養因子だけの導入後の細胞(N)に比較して、Nurr-

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

1 のアップレギュレーションが GDNF の投与後に認められた (Ng)。図 19 e は、ラット MSC における TH のウェスタン・ブロットを示す。TH 発現は、栄養因子導入後の MSC (N) において弱かったが、GDNF 投与後に高まった (Ng)。副腎髄質 (A) は、ポジティブ・コントロールとして役立つ。レーン 1 はウェスタン・ブロットングであり、そしてレーン 2 はボンソー S 染色である。図 19 f は、ラット MSC を線状体に移植した挙動効果を示すグラフである。MSC 群 (▲-▲)、N-MSC 群 (●-●)、及び G-MSC 群 (■-■) におけるアポモルフィン誘導回転分析結果を示すグラフである (* : $0.01 < p < 0.05$; ** : $p < 0.01$)。図 19 g ~ k は、G-MSC 群における移植後 10 週目における線状体内の neurofilament-M (g)、TH (h)、DAT (i)、GFAP (j)、及び O4 (k) の免疫染色写真である。上記マーカーに関するシグナルは全て、Alexa 546 (赤色コーディング) により標識した。移植したラット MSC を、最初に GFP で標識した。GFP-neurofilament、GFP-TH、及び GFP-DAT の倍化が g, h, i において観察されたが、GFAP 染色と O4 染色においては観察されなかった。バーは $50 \mu\text{m}$ である。図 19 l は、線状体内への GFP 標識ラット MSC (G-MSC 群) の一体化を示す。ダイアグラムは、切断面の描画を示す。TH に関する免疫組織化学後共黒画像 (赤) は、上記ダイアグラム内の点によりマークされた領域から示される。バーは $50 \mu\text{m}$ である。図 19 m は、GDNF 処理ヒト神経細胞化 MSC の移植後のラットにおけるアポモルフィン誘導回転を示すグラフである。5 匹のラットからの結果 (平均回転 0.44 ± 0.2) を、移植から 4 週間後に示す (各色は 1 匹のラットを表す)。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

発明の詳細な説明

発明者らは骨髄間質細胞に対して形態形成の初期において中心的な役割を果たす遺伝子の導入が骨髄間質細胞をなんらかの形で刺激し、この刺激が骨髄間質細胞の分化・誘導に及ぼす影響について調べてみた。すなわち、特に神経系の発生分化において重要な役割を果たしており、前駆細胞が神経細胞とグリア細胞とに分かれる時点で運命決定に作用しているとされているN o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング遺伝子を導入することによって骨髄間質細胞をリセット（初期設定）することができるかもしれないと期待した。

ここで、重要なことは、N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子が細胞の分化・誘導を抑制するということは示唆・教示されていたものの、以下に詳述するように、N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入を他の分化・誘導のための刺激と組み合わせることにより、N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された細胞自体（N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された細胞に接触した細胞ではない）が分化・誘導されうるということは全く予想外の出来事であるということである。本願発明にかかる分化・誘導方法において、N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入が骨髄間質細胞の発生・分化をリセットすることができたと断言することはできない。しかしながら、かかる遺伝子導入を他の分化・誘導ステップと組み合わせることにより、本願発明は、結果として、骨髄間質細胞を効率よく神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法を提供すること可能にしたといえる。

今般、本願発明者らは、N o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入を含む複数ステップの組み合わせ実験を繰返した結果、骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

筋細胞に、効率よく分化・誘導することに初めて成功した。さらに、かかる分化誘導方法により得られた神経細胞をパーキンソンモデルラットや、視神経損傷による網膜・視神経変性モデルラットに移植することにより実際に神経が生着・機能することを確認し、ここに本願発明を完成するに至った。

驚くべきことに、骨髄間質細胞にN o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入し、さらに分化開始における一般的なトリガーと考えられている細胞内c A M Pの上昇及び神経分化に作用すると考えられている種々の因子・サイトカインを投与することによってインビトロ培養条件において骨髄間質細胞を神経細胞に分化・誘導することに成功した。神経細胞に特異的なM A P - 2、神経細線維（N e u r o f i l a m e n t）のみならず、神経伝達物質、及びその合成酵素であるチロシン・ヒドロキシラーゼ（T y r o s i n e - h y d r o x y l a s e）、アセチルコリン（A c e t y l c h o l i n e）、ニューロペプチドY（N e u r o p e p t i d e Y）、サブスタンスP（S u b s t a n c e P）などの発現も確認した。

一方、1個又はごく少数の遺伝子が5-アザシチジン（5-A Z C）処理によって脱メチル化され、活性化されることによって筋芽細胞への転換が起こることが示唆されている（Taylor SM, Jones PA: ell 17: 771-779, 1979、及び鍋島陽一、生体の科学 47(3): 184-189, 1996を参照のこと）。そこで、我々は、上記の神経細胞におけるN o t c h遺伝子及びN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入を、上記5-アザシチジン（5-A Z C）処理による脱メチル化と組み合わせてみた。具体的には、上記脱メチル化剤を用いて遺伝子のメチル化による発現抑制を解除することによって骨髄間質細胞をリセットし、次にN o t c h及びN o t c hシグナリング関連

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

遺伝子を導入し、次に上記遺伝子が導入された細胞を上記遺伝子を導入していない骨髄間質細胞とともに共培養し（*co-culture*）、そして最後に分化開始における一般的なトリガーと考えられている細胞内 *cAMP* の上昇作用物質で処理することによって、*Notch* 及び *Notch* シグナリング関連遺伝子が導入された細胞を、インビトロにおける培養により骨格筋細胞に分化・誘導することに成功した。得られた細胞は、特徴的な多核を有する筋管の形成と横紋を認め、筋肉に特異的なミオゲニン（*myogenin*），*Myf5* の発現も *mRNA* レベルで確認した。

本発明の 1 の態様においては、骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、上記細胞内に *Notch* 遺伝子及び／又は *Notch* シグナリング関連遺伝子を導入することを含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記の *Notch* 遺伝子及び／又は *Notch* シグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法が提供される。

本発明の他の態様においては、骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経前駆細胞を得る方法であって、以下のステップ：

- （1）骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；及び
- （2）上記細胞内に *Notch* 遺伝子及び／又は *Notch* シグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養して神経前駆細胞を得る；

を含む、前記分化・誘導方法が提供される。

前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞であることができる。

本発明の他の態様においては、前記方法により製造された神経前駆細胞が提供される。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

本発明の他の態様においては、神経前駆細胞マーカー、G L A S T、3 P G D H、及びネスチンを発現する神経前駆細胞が提供される。

本発明の他の態様においては、骨髓間質細胞をインビトロにおいて神経細胞に分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髓から骨髓間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記細胞内にN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；及び
- (3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された骨髓間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法が提供される。

前記標準的な基礎培地はイーグルス (E a g l e ' s) アルファ修飾最小必須培地であることができ、そして前記血清はウシ胎児血清であることができる。

前記N o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入は、哺乳動物発現ベクターを用いたリポフェクションにすることができる。

前記ステップ(2)と(3)の間に、前記遺伝子が導入された細胞の選択を所定期間行うステップをさらに含むことができる。

前記サイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPア

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

ナログは、フォルスコリン (Forskolin) であることができ、その濃度は、 $0.001 \text{ nM} \sim 100 \mu \text{M}$ であることができる。

前記細胞分化生存作用性因子は、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic-Fibroblast growth factor (bFGF))、毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor (CNTF))、及びそれらの混合物から成る群から選ばれることができる。

前記細胞分化生存作用性因子の濃度は、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu \text{g/ml}$ であることができる。

前記の単離された骨髄間質細胞は好ましくはヒト細胞である。

本発明の他の態様においては、前記方法により製造された神経細胞が提供される。

本発明の他の態様においては、神経細胞マーカー、3型 β -チューブリン (β -tubulin isotype 3)、及びTuJ-1を発現する神経細胞が提供される。

本発明の他の態様においては、骨髄間質細胞をインビトロにおいてドーパミン作動性ニューロンに分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- (3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得；

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

(4) ステップ (3) において得られた神経細胞を、標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で培養し；及び

(5) グリア由来神経栄養因子 (G l i a l d e r i v e d n e u r o t r o p h i c f a c t o r (G D N F))、及びサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は上記グリア由来神経栄養因子以外の細胞分化生存作用性因子を、上記培養液に添加し、そしてさらに培養して、ドーパミン作動性ニューロンを得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導されたドーパミン作動性ニューロンが、上記のN o t c h 遺伝子及び／又はN o t c h シグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法が提供される。

前記ステップ (4) における標準的な基礎培地が、イーグルス (E a g l e ' s) アルファ修飾最小必須培地である、請求項 18 に記載の分化・誘導方法。

前記ステップ (4) における血清はウシ胎児血清であることができる。

前記ステップ (5) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログは、フォルスコリン (F o r s k o l i n) であることができる。また、前記ステップ (5) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度は、0.001 nM ~ 100 μ Mであることができる。

前記ステップ (5) における、グリア由来神経栄養因子以外の細胞分化生存作用性因子は、塩基性線維芽細胞成長因子 (b a s i c - F i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r (b F G F

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

))、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA))、及びそれらの混合物から成る群から選ばれることができる。

前記ステップ (5) におけるグリア由来神経栄養因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であることができ、好ましくは、 $1 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ ng/ml}$ である。

前記ステップ (5) における、グリア由来神経栄養因子以外の細胞分化生存作用性因子の濃度は、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であることができる。

好ましくは、前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である。

本発明の他の態様においては、前記方法により製造されたドーパミン作動性ニューロンが提供される。

本発明の他の態様においては、骨髄間質細胞をインビトロにおいてアセチルコリン作動性ニューロンに分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- (3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得；
- (4) ステップ (3) において得られた神経細胞を、標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で培養し；及び
- (5) 神経成長因子 (Nerve growth factor) (NGF)、及びサイクリックAMP上昇作用性剤

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は上記神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子を、上記培養液に添加し、そしてさらに培養して、アセチルコリン作動性ニューロンを得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導されたアセチルコリン作動性ニューロンが、上記のNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法が提供される。

前記ステップ（４）における標準的な基礎培地は、イーグルス（Eagle's）アルファ修飾最小必須培地であることができる。また、前記ステップ（４）における血清はウシ胎児血清であることができる。

前記ステップ（５）におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログは、フォルスコリン（Forskolin）であることができる。また、前記ステップ（５）におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度は、 $0.001\text{ nM} \sim 100\text{ }\mu\text{M}$ であることができる。

前記ステップ（５）における、神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子は、塩基性線維芽細胞成長因子（basic-Fibroblast growth factor (bFGF)）、血小板由来成長因子（platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA)）、及びそれらの混合物から成る群から選ばれることができる。

前記ステップ（５）における神経成長因子の濃度は、 $0.001\text{ ng/ml} \sim 100\text{ }\mu\text{g/ml}$ であることができ、好ましくは、その濃度は、 $1\text{ ng/ml} \sim 100\text{ ng/ml}$ である。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

前記ステップ（５）における、神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子の濃度は、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ であることができる。

好ましくは、前記の単離された骨髄間質細胞はヒト細胞である。

本発明の他の態様においては、前記方法により製造されたアセチルコリン作動性ニューロンが提供される。

本発明の他の態様においては、骨髄間質細胞をインビトロにおいて骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- （１）骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- （２）上記培養液に脱メチル化剤を添加し、そしてさらに培養し；
- （３）サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養し；
- （４）上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- （５）上記の遺伝子導入された細胞と、遺伝子導入のされていない無処理の上記骨髄間質細胞とを共培養し；及び
- （６）サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログを上記培養液に添加し、そしてさらに培養して骨格筋細胞を得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法が提供される。

前記標準的な基礎培地はイーグルス（Eagle's）アルファ

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

修飾最小必須培地であることができ、また、前記血清がウシ胎児血清であることができる。

前記脱メチル化剤は5-アザシチジン (5-azacytidine) であることができ、その濃度は $30 \text{ nmol/l} \sim 300 \mu\text{mol/l}$ であることができる。

前記ステップ (3) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログは、フォルスコリン (Forskolin) であることができる。

前記ステップ (3) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度は、 $0.001 \text{ nM} \sim 100 \mu\text{M}$ であることができる。

前記細胞分化生存作用性因子は、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic-Fibroblast growth factor (bFGF))、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA))、ヘレグリン (Heregulin)、及びそれらの混合物から成る群から選ばれることができ、その濃度は、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であることができる。また、前記Notch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子の導入は、哺乳動物発現ベクターを用いたリポフェクションによることができる。

前記ステップ (4) と (5) の間に、前記遺伝子が導入された細胞の選択を所定期間行うステップをさらに含むことができる。

前記ステップ (5) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログは、フォルスコリン (Forskolin) であることができる。

前記ステップ (5) におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度は、 $0.001 \text{ nM} \sim 100$

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

μ Mであることができる。

好ましくは、前記の単離された骨髄間質細胞はヒト細胞である。

本発明の他の態様においては、前記方法により製造された骨格筋細胞が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の前記神経前駆細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで、上記神経前駆細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療に効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項4に記載の神経前駆細胞の使用が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の前記神経細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項16に記載の神経細胞の使用が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、神経細胞マーカー、3型 β -チューブリン (β -tubulin isotype 3)、及びTuJ-1を発現する治療的有効量の前記神経細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、神経細胞マーカー、3型 β -チューブリン (β -tubulin isotype 3)、及びTuJ-1を発現する治療的有効量の前記神経細胞の使用が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の前記ドーパミン作動性ニューロンを、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の前記ドーパミン作動性ニューロンの使用が提供される。

本発明の他の態様においては、前記疾患、障害又は症状はパーキンソン病であることができる。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の前記アセチルコリン作動性ニューロンを、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

本発明の他の態様においては、中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の前記アセチルコリン作動性ニューロンの使用が提供される。

前記疾患、障害又は症状は、ALS（筋萎縮性側索硬化症）及びアルツハイマー病から成る群から選ばれることができる。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

本発明の他の態様においては、変性性筋肉疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の前記骨格筋細胞を、上記患者の筋肉変性部位に投与することを含み、ここで上記骨格筋細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法が提供される。

本発明の他の態様においては、変性性筋肉疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の前記骨格筋細胞の使用が提供される。

前記疾患、障害又は症状は筋ジストロフィーであることができる。

本願明細書中、用語「骨髄間質細胞」とは、骨髄中に存在する造血系以外の細胞をいい、骨、軟骨、脂肪細胞等の細胞に分化できると考えられている。骨髄間質細胞は、CD29 ($\beta 1$ -インテグリン)、CD90 (Thy-1)、及びCD54 (ICAM-1) が陽性であるが、CD34 (造血幹細胞マーカー)、及びCD11b/c (マクロファージ・マーカー) が陰性であることにより識別しうる。

本願明細書中に使用するとき、分化誘導において用語「効率よく」とは、本願発明に係る分化・誘導方法により、前記選択後の骨髄間質細胞が、最終に神経細胞又は骨格筋細胞に変換される割合が高いことをいう。本願発明に係る分化・誘導方法においては、この効率は、50%以上、好ましくは75%以上、好ましくは80%以上、好ましくは85%以上、好ましくは90%以上、そして最も好ましくは95%以上である。

本願明細書中、用語「神経前駆細胞」とは、Notch遺伝子及び/又はNotchシグナリング関連遺伝子導入直後の骨髄間質細胞をいい、その後に行われるべき栄養因子導入が未だ行われていな

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

い細胞をいう。

本願明細書中、用語「神経細胞」とは、ニューロン (neuron) のことをいい、形態学的には、細胞体と2種類の突起(樹状突起と軸索)を特徴とし、そして生化学的には β -tubulin isotope 3、及びTuJ-1に対する抗体と反応するものをいう。

また、神経細胞は、神経伝達物質、及びその合成酵素である、例えば、チロシン・ヒドロキシラーゼ (TH; Tyrosine hydroxylase), 小胞アセチルコリン・トランスポーター (Vesicular acetylcholine transporter), ニューロペプチドY (Neuropeptide Y), サブスタンスP (SP; Substance P) 等を分泌することを特徴とする。

ここで、上記チロシン・ヒドロキシラーゼは、ドーパミン作動性ニューロンの指標であり、そして小胞アセチルコリン・トランスポーターは、運動性ニューロンに代表されるアセチルコリン作動性ニューロンの指標である。

本願明細書中、用語「グリア細胞」とは、中枢神経において、ニューロンとその突起の間を埋めているアストロサイト、オリゴデンドロサイト、マイクログリアと上皮細胞をいう。

ここで、グリアル・フィブリラー酸性タンパク質 (Glial fibrillar acidic protein (GFAP)) は、アストロサイトの指標であり、そして、O4は、オリゴデンドロサイトの指標である。

本願明細書中、用語「骨格筋細胞」とは、筋線維又は筋肉線維のことをいい、骨格筋の単一筋細胞である。形態学的には、細長い巨大な多核であり、筋管の形成と横紋があり、そして生化学的にはミ

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

オゲニン (myogenin) Myf5 などの転写制御因子の発現を特徴とする。

本願発明に係る骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法は、上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入するステップを含む点で新規である。さらに、新規のステップを従来技術の他の分化・誘導ステップと一定の順序で組み合わせる点においても新規である。本願発明における上記ステップの選択及び最適な組み合わせは、本願発明者らにより初めて発見された意義はひじょうに高いといえる。なぜなら、骨髄間質細胞が、骨芽細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞等に分化誘導される可能性がある間葉系の幹細胞又は前駆細胞であることは判っていたとしても、骨髄間質細胞を、実際に、神経細胞又は骨格筋細胞に分化させることができるかどうかについては知られておらず、かつ、切望されていたにも拘らず未だかつて誰も実際にこれに成功した者はいなかったからである。いずれの理論に拘束されることを望まないが、本願発明者らは、上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入することが、細胞の発生・分化をリセットするように機能し、そして他の分化・誘導処理の働きを助けると推定する。

以下の実施例により、本願発明をさらに詳細に説明する。但し、本願発明の範囲を何ら限定するものと解してはならない。

実施例

実施例 1：神経誘導

成体ラット (Wister 種) の骨髄より間質細胞を採取し培養する。培地はMinimum Essential Medium

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Alpha Eagle

Modification (Sigma 社、M4526) に 20 % のウシ胎児血清 (Biowhitaker 社、14-501F, Lot # 61-1012) を加えたものを用いた。

4代まで継代培養し、80-90%の集密 (confluence) に達した時点でNotch細胞内ドメインの遺伝子を導入した。これはPromega 社、pCI-neo哺乳動物発現ベクター (#E1841) のEcoRI-XbaIマルチクローニング部位に、3.1 kbのNotch細胞内ドメインのEcoRI-XbaI断片を挿入し組み換えたものであった。導入には、LipofectAMINE 2000 (GibcoBRL, 11668-027) のシステムを用いた。

導入の翌日にG418 sulfate (GibcoBRL, 83-5027) を 200 ng/ml の濃度で添加し導入細胞の選択 (selection) を 10 日間行った。

細胞数が90%集密を回復した後、Forskoline 5 μ M (Calbiochem, 344273)、basic-Fibroblast growth factor 10 ng/ml (Peprotech EC, LTD, 100-18B)、ciliary neurotrophic factor 50 ng/ml (R&D Systems, 557-NT) を添加した。

10 日程たって細胞を解析した結果、図1に示すように、神経細胞に特徴的な形態が観察された。誘導された細胞は、図2に示すように、以下の抗体、MAP-2 (Chemicon MAB364)、neurofilament (Boehringer Mannheim, 814342)、nestin (Bioproducts, BMS4353) に対して陽性反応を示した。MAP-2と

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

neurofilament は神経細胞の、nestin は神経前駆細胞のマーカーであるため、誘導された細胞は神経細胞としての性質を持つものと判断できる。

また、図 3 に示すように、神経伝達物質、及びその合成酵素である Tyrosine-hydroxylase (Chemicon AB151)、Vesicular acetylcholine transporter (Chemicon AB1578)、Neuropeptide Y (Peninsula Lab INC, RIN7172)、Substance P (Amersham INC, RPN1572) 等の抗体を用いて検索したところ、それぞれ 2～4 % 前後の陽性細胞を認めたため、神経伝達物質を持つ神経細胞も存在することが分かった。

上記操作によって神経細胞が誘導されるが、この段階では、図 5 のグラフの左側に示すように、ドーパミン作動性ニューロンの指標であるチロシン・ヒドロキシラーゼに対して反応する分化誘導された神経細胞は、全神経細胞の 2.9 ± 0.5 % であった。また、図 7 のグラフの左側に示すように、運動ニューロンに代表されるアセチルコリン作動性ニューロンの指標である Vesicular acetylcholine transporter に対して反応する分化誘導された神経細胞は、全神経細胞の 1.78 ± 0.75 % であった。

実施例 2 : ドーパミン作動性ニューロンの誘導

上記の分化・誘導された神経細胞を、以下の培地中でさらに培養する。培地は、Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (Sigma 社、M4526) に 10 % のウシ胎児血清 (Biowhitaker 社、14-501F, Lot # 61-1012) を加えた

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

ものであり、さらに、グリア由来神経栄養因子 (G l i a l d e r i v e d n e u r o t r o p h i c f a c t o r (G D N F ; P e p r o t e c h E C L T D , h u m a n r e c o m b i n a n t G D N F , # 4 5 0 - 1 0) 5 0 n g / m l , F o r s k o l i n 5 μ M (C a l b i o c h e m , 3 4 4 2 7 3) , b a s i c - F i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r 1 0 n g / m l (P e p r o t e c h E C , L T D , 1 0 0 - 1 8 B) , P l a t e l e t - d e r i v e d g r o w t h f a c t o r - A A 5 n g / m l (P e p r o t e c h E C L T D , 3 9 6 - H B) を添加したものであった。

かかる操作により、チロシン・ヒドロキシラーゼに対して反応するドーパミン作動性ニューロンは、全神経細胞に対して、17.2 \pm 5.1%まで劇的に上昇した (図5のグラフの右側参照)。図4の写真に示すように、G D N F 投与後に、F I P C で緑に染色されるタンパク質チロシン・ヒドロキシラーゼの割合が劇的に上昇した。

実施例3：アセチルコリン作動性ニューロンの誘導

実施例1において分化・誘導された神経細胞を、以下の培地中でさらに培養する。培地は、M i n i m u m E s s e n t i a l M e d i u m A l p h a

M o d i f i c a t i o n (S i g m a 社、M 4 5 2 6) に10%のウシ胎児血清 (B i o w h i t t a k e r 社、1 4 - 5 0 1 F , L o t # 6 1 - 1 0 1 2) を加えたものであり、さらに、神経成長因子 (N e r v e g r o w t h f a c t o r) (2 . 5 S N G F , T a k a r a , # T 0 0 2 A) 5 0 n g / m l , F o r s k o l i n 5 μ M (C a l b i o c h e m , 3 4 4 2 7 3) , b a s i c - F i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

10 ng/ml (Peprotech EC, LTD, 100-18B), Platelet-derived growth factor-AA 5 ng/ml (Peprotech EC LTD, 396-HB) を添加したものであった。

かかる操作により、Vesicular acetylcholine transporter に対して反応するアセチルコリン作動性ニューロンは、全神経細胞に対して、 $20.5 \pm 0.05\%$ まで劇的に上昇した (図7のグラフの右側参照)。図6の写真に示すように、NGF (Neurotrophin (NTs)) 投与後に、FIPCで緑に染色されるタンパク質 Vesicular acetylcholine transporter の割合が劇的に上昇した。

実施例4：骨格筋誘導

成体ラット (Wister 種) の骨髓より間質細胞を採取し培養する。培地は Minimum Essential Medium Eagle Modification (Sigma 社、M4526) に20%のウシ胎児血清 (Biowhitaker 社、14-501F, Lot #61-1012) を加えたものを用いた。

4代まで継代培養し、80-90%の集密に達した時点で5-アザシチジン (5-Azacytidine) を $3 \mu\text{mol/l}$ を添加し、24時間培養した。

その後、Forskoline $5 \mu\text{M}$ (Calbiochem, 344273)、basic-Fibroblast growth factor 10 ng/ml (Peprotech EC, LTD, 100-18B)、Platelet-derived growth factor-AA 5 ng/ml (Peprotech EC LTD, 396-HB)、Heregulin

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

200 ng/ml (R&D Systems, 396-HB) を培地に添加したものに切り替えて7日間培養した。

その後、Notch細胞内ドメインの遺伝子を実施例1におけるのと同様に導入した。

導入の翌日にG418 sulfate (GibcoBRL, 83-5027) を200 ng/mlの濃度で添加し導入細胞の選択(selection)を10日間行った。

細胞数がほぼ100%の集密を回復した後、上記遺伝子の導入されていない無処理の骨髄間質細胞を培地に加えてこれとともに共培養(co-culture)した。

3日後、Forskolin (Calbiochem, 344273) 5 μ Mを添加した。数日後に、細胞が融合し多核の骨格筋細胞が局所的に出現し(図8参照)、そして経時的に増加した(図9参照)。図10に見られるように、多核の骨格筋細胞が共焦点レーザー顕微鏡において観察された。これらの細胞ではmyogenin及びMyf5のmRNAの発現がRT-PCRにおいて確認された。また電子顕微鏡観察により、骨格筋に特徴的な筋線維が認められた。

実施例5：ラットのパーキンソン病モデルを用いた、本願発明に係る分化・誘導方法により得られたドーパミン作動性ニューロンの、線状体への移植による治療効果

本願発明に係る分化・誘導方法により得られたドーパミン作動性ニューロンを、ラットのパーキンソンモデルに適用して移植の効果を検討した。ラットの脳の黒質に6-OHDA (6-hydroxydopamine) を注入することによってパーキンソンモデルを作成する方法はすでに確立されており、今回もそのモデルを用いた(例えば、Svendsenら、Exp. Neurol. 137

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

: 376-388 (1996); Svensenら、Exp. Neurol. 148, 135-146 (1997))。このモデルにおいてはアポモルフィンを投与することによってラットが回転運動することが判っており、この回転数が増加すれば症状の悪化を、減少すれば改善を示唆する。

図11の上段に示すように、9週間の観察期間では、神経細胞に誘導しただけのものを線状体に移植した場合、回転数は移植直後とほぼ横ばいであった。何も処置を施さない場合、回転数はどんどん増加する傾向にあるため（図示せず）、横ばいということは少なくとも悪化を防いでいる、と言える。

図11の下段に示すように、ドーパミン作動性の誘導をかけたものを線状体に移植した場合、移植1週目より回転数が減少しはじめ、約半数の動物で、9週後に回転数がゼロ、又は1～2回という非常に顕著な改善を認めるに至った。（尚、図11の下段に示す9週後に8回転数/分を超える2つのケースは、移植操作に失敗したものと考えられるので評価から除外した。）

線状体に注入（移植）された本願発明に係るドーパミン作動性ニューロンが、どのような細胞に分化したかを調べるために、10週後に、上記線状体組織を採取し、その切片を作成して免疫組織化学的検査を実施した。

骨髄間質細胞は、レトロウイルスにより、緑色蛍光を発するグリーン・フルオレッセント・プロテイン（GFP）を産生する遺伝子をその染色体内に組込んである。したがって、図12中の免疫蛍光写真において、骨髄間質細胞から分化誘導された神経細胞、それ故、線状体に移植されたドーパミン作動性ニューロンは、緑色の蛍光を発している。

一方、神経細胞をNeurofilamentを指標として、ド

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

ドーパミン作動性ニューロンをチロシン・ヒドロキシラーゼを指標として、グリア細胞であるアストロサイトをGFAPを指標として、そして同じくグリア細胞であるオリゴデンドロサイトをO4を指標として、それぞれ、赤色で発色させた。

したがって、上記GFAPによる緑色と、上記赤色による発色が重なれば、黄色に発色することになり、これは、移植されたドーパミン作動性ニューロンが、移植から10週後にどの細胞になっていたかを表すことになる。

図12に見られるように、移植から10週後の線状体においては、移植された細胞はほぼ全てが神経細胞になっており、グリア細胞にはなっていなかった。また、チロシン・ヒドロキシラーゼ陽性の神経細胞（すなわち、ドーパミン作動性ニューロン）が相当数にのぼっていることから、インビトロにおける本願発明に係る分化・誘導方法によってドーパミン作動性ニューロンの全神経細胞に対する割合を、 $17.2 \pm 5.1\%$ まで高めることができたけれども、上記移植によって、この割合をさらに高めることができたことが分かる。

図13に、チロシン・ヒドロキシラーゼを発色させた免疫蛍光写真を拡大したものを示す。図13中、細胞の核を、細胞種を問わず、青色で染色した（Counter stain）。青色で表される核の位置が、細胞の位置を示す。

以上により、ラットのパーキンソン病モデルにおいて、本願発明に係る分化・誘導方法によって得られたドーパミン作動性ニューロンを、線状体に移植することにより、パーキンソン病の症状を劇的に改善することが認められた。

以下の実施例6～11においては、下記実験プロトコルを用いた

。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

実験プロトコル

骨髄間質細胞の培養

Wistar ラットの骨髄からのMSCの単離は、本発明者らの先の論文に記載されている(4)。ヒト細胞に関して、MSCを、商業的に入手可能な源 (PT-2501, BioWhittaker, Walkersville, Maryland) 及び健康なドナー (インフォームド・コンセントを京都大学大学院医学研究科の倫理委員会のガイドラインに従って得た) から得た。ヒトMSCは先に記載されているように単離した(3)。細胞を、10%胎児ウシ血清 (FBS) を含むアルファMEM (M-4526, Sigma, St Louis, Missouri) 中で培養した。

FACS分析

ラットMSCにおいては、細胞を、FITC標識されたマウス抗CD34 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California)、抗-CD54、CD90、及びCD11b/c又はハムスター抗-CD29 (PharMingen, San Diego, California) とともにインキュベートした。対照は、FITC標識された抗-マウス又はハムスターIgG、又は抗-免疫マウス血清のいずれかとともにインキュベートした。ヒトMSCにおいては、フィコエリスリン (phycoerythrin) 標識されたマウス抗-CD34、CD29、CD90、CD54、CD11c、及びvon Willebrand因子を使用した。また、対照は、フィコエリスリン標識された抗-マウスIgGにより染色される細胞を含んでいた。データを採取し、そしてCell Questソフトウェアを備えたFACS caliber (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) 上で分析した。

プラスミド

Notch 1のナンバリングはWeinmaster et al (1991) 39に

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

従う。m-N o t c h 1細胞内ドメインN I C D (アミノ酸1703から始まり、そして3' 非翻訳配列で終る)、T M (アミノ酸1747-2531)、M2 (2つのアミノ酸A l a - A l a (1992と1993) からG l u - P h e への突然変異によりT M から変更されている) (N I C D、T M、及びM2はDr. Masashi Kawachiにより提供された) (17, 34)、mN I C Δ3' (アミノ酸1846-2477、Dr. Jeffery Nyeにより提供された) (35)、R A M I C (アミノ酸1703-1969、N o t I とA c c I I I による消化によりN I C D c D N A から得た)、及びT A D I C (アミノ酸2192-2531、X h o I とI b a I 消化によりN I C D c D N A から得た) のc D N A を、p C I - n e o 哺乳動物発現ベクター (Promega, Madison, Wisconsin) 内にサブクローニングした。3-P G D H (全長とM1965の両者) のルシフェラーゼ・リポーター・プラスミドはDr. Shigeki Furuyaにより提供され(19)、Neuro DはMing-Jer Tsaiにより提供され(40)、そしてG F A P プロモーターはCaleb E Finch により提供された(41)。M S C を、l i p o f e c t a m i n e 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) を用いて上記プラスミドを用いてトランスフェクトし、そして製造者の指示に従ってG418により選択した。

神経誘導実験

栄養因子導入のために、N I C D 移入M S C のサブコンフルエント・カルチャーを、10% F B S、5 μ M F S K (Calbiochem, La Jolla, California)、10 ng/ml b F G F (Peprotech, London, UK)、及び10 ng/ml C N T F (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota) を含有するアルファMEM中でインキュベートした。G D N F 処理のために、50 ng/mlのG D N F (P e p r

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

o t e c h) を、10% F B S 含有アルファ- M E M 培養基中に投与した。

B r d - U 標識付け

栄養因子導入後 (5 日目) に、B r d - U (10 μ M) を上記培養基に添加し、24 時間培養した。その後、細胞を P B S 中 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、M A P - 2 a b と B r d - U の 2 重標識付けを行い、その後、T O T O - 3 (Molecular Probes) 対比染色を行った。

R T - P C R 分析

全細胞 R N A を、S V 全 R N A 単離装置 (P r o m e g a) を使用して単離した。異なる m R N A の対比的発現を分析するために、c D N A の量を、遍在的に発現される β - アクチン m R N A からのシグナルに基づき正規化した。P C R を、T a q ポリメラーゼ (S i g m a) を用いて標準的なプロトコールを用いて行った。サイクリング・パラメーターは、94 $^{\circ}$ C、30 分間の変性、プライマーに依存して 54 ~ 68 $^{\circ}$ C、1 分間のアニーリング、そして 72 $^{\circ}$ C で伸長、35 サイクル数であった。

免疫細胞化学分析

詳しい手順は先に記載されている (4)。G L A S T に対する抗体は、Dr. Masahiko Watanabe により提供され (18)、そして 3 - P G D H に対するものは、Dr. Shigeki Furuya により提供された (19)。以下の 1 次抗体は商業的に購入した：ネスチン (n e s t i n) (1 : 500, PhaMingen)、M A P - 2 a b (1 : 250, Sigma)、ニューロフィラメント-M (neurofilament-M) (1 : 200, Chemicon, Temecula, California)、3 型 β - チューブリン (β - t u b u l i n i s o t y p e 3) (1 : 400, Sigma)、T u J - 1 (1 : 100, Babco, Richmond, California)

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

)、G F A P (1 : 1 , DAKO, Carpinteria, California) 、 O 4 (1 : 2 0 , Boehringer Mannheim, Germany) 、 C a l C (1 : 3 0 , Chemicon) 、 G A B A (1 : 1 0 0 0 , Sigma) 、セロトニン・トランスポーター (Serotonin transporter) (1 : 2 0 0 , Chemicon) 、小胞アセチルコリン・トランスポーター (vesicular acetylcholine transporter) (1 : 1 0 0 , Chemicon) 、グルタミン (G l u t a m i n e) (1 : 1 0 0 , Chemicon) 、ニューロペプチド Y (N e u r o p e p t i d e Y) (1 : 1 0 0 0 , Peninsula Laboratories Inc., Belmont, California) 、T H (1 : 2 0 0 , Chemicon) 、V I P (1 : 5 0 0 , Incstar, Stillwater, Minnesota) 、C G R P (1 : 1 2 0 0 , Amersham, Buckinghamshire, UK) 、S P (1 : 5 0 0 , Amersham) 、D A T (1 : 2 0 0 , Chemicon) 。細胞を、A l e x a F l u o r 4 8 8 又は 5 4 6 結合第 2 抗体とともにインキュベートし、そしてヨウ化 T O T O - 3 対比染色を行った。共焦点レーザー走査顕微鏡 (Radiant 2000, Bio-Rad, Hertfordshire, UK) 下で、検査を実施した。

リポーター・アッセイ

細胞を、製造者の指示書に従って l i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションから 4 8 時間後に、2 重ルシフェラーゼ・アッセイ・キット (P r o m e g a) を用いて F i r e f l y ルシフェラーゼ活性と R e n i l l a ルシフェラーゼ活性について、細胞をアッセイした。F i r e f l y ルシフェラーゼ値を、R e n i l l a ルシフェラーゼを発現するプラスミドを含ませることによりトランスフェクションの効率について補正した。

ウェスタン・プロット分析

細胞溶解物を調製し、そして 5 0 μ g の溶解タンパク質を、5 %

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

及び10% SDS ポリアクリルアミド・ゲル上で電気泳動した。MAP-2 (1:500, Chemicon)、GFAP (1:500, Dako)、及びTH (1:1000, Chemicon) 抗体に対する抗原をアルカリ・ホスファターゼを用いて検出した。

電気生理学的方法

電流を、CEZ-2300 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) パッチークランプ増幅装置を用いて、室温 (20~25℃) で計測した。データ取得と刺激を、pClamp 6.0ソフトウェア (Axon Instruments, Inc., Foster City, California) を用いて制御した。信号を5 kHz においてフィルターにかけ、そして10~50 kHz においてサンプリングした。実験を、4~8 MΩ のレンジ内の抵抗値をもってピペット (ホウケイ酸ガラス、Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、全細胞パッチークランプ配置において行った。遅延直流カリウム電流を記録するため、標準細胞外溶液は、(mM において) NaCl (150)、KCl (4)、CaCl₂ (2)、MgCl₂ (2)、グルコース (10)、Hepes (10) (pH 7.4 NaOHによる) を含んでいた。標準ピペット溶液は、(mM において) KCl (130)、MgCl₂ (5)、EGTA (10)、及びHepes (10) (KOHによりpH 7.4) であった。

パーキンソン病モデル・ラットの分析

このモデルを作出する手順は先の論文中に記載されている (45)。簡単に言えば、成体雄Wistarラット (体重250~300 g) を、ナトリウム・ペントバルビタール (40 mg/kg、腹腔内) により麻酔し、そして6-OHDA溶液 (8 µg/0.1%アルコルビン酸-生理食塩水4 µl) を左内側前脳束内に注射した (A/P = -4.4 mm; L = プレグマから+1.1 mm、V = 硬膜から-7.7 mm)。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

延長対側性回転を、標的挙動として使用した。アポモルフィン投与（ 0.8 mg/kg 、皮下）から30分後に1分当り6回転未満の平均を示すラットは除外した。 1×10^5 細胞/ $8 \mu\text{l}$ を、以下の座標の病変線状体内に移植した： $A/P = +0.5 \text{ mm}$ ； $L = \text{ブレグマ}$ から $+3.0 \text{ mm}$ 、及び $V = -4.5 \text{ mm}$ 。動物数は： MSC 群、5匹； $N-MSC$ 群、6匹； $G-MSC$ 群、10匹であった。

移植された線状体（術後10週間、 $G-MSC$ 群）の免疫細胞化学的分析のために、クリオ切片を、ニューロフィラメント-M、 TH 、 DAT 、 $GFAF$ 、及び $O4$ に対する抗体とともにインキュベートした。そしてこれらを次に、 $Alexafluor 546$ 標識2次抗体（ $Molecular Probes$ ）、その後のヨウ化 $TOTO-3$ 対比染色により検出した。

ヒト MSC 移植の場合、5匹の動物に移植し、毎日、 $FK506$ （ 1 mg/kg 、Fujisawa, Osaka, Japan）の皮下注射により免疫抑制した。移植から4週間後、アポモルフィン誘導回転を計測した。 $HPLC$ におけるドーパミン計測のために、 1 mm 厚の冠状脳切片を得（ A/P ブレグマから $+2.5 \text{ mm} \sim -1.5 \text{ mm}$ ；合計4切片）、中央線において分け、そして各側を、 $10\% FBS$ 含有アルファ- MEM 中で別々に培養した。24時間後、それらの培養基を回収し、そして $HPLC$ 分析を、 $SRL Communication and Health$, Tokyo, Japanにより実施した。動物実験の全てが、京都大学大学院医学研究科の動物飼育及び実験委員会により承認された。

統計データ

データを、平均 $\pm SEM$ として表す。データを、 $Bonferroni$ 法による対比較を用いた $AVOVA$ を使用して比較した。 0.05 < の p 値は、有意差と認められ、そして < 0.01 は有意差が大きい。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

実施例 6 : M S C の同定

ラット M S C とヒト M S C を本試験に使用した。ラット (W i s t a r 株) M S C を、先に記載されたように単離し、そして培養した (4)。ヒト M S C を健康なドナーから得るか又は商業源 (B i o W h i t t a k e r) から購入した。

細胞表面マーカーを、蛍光活性化細胞分析 (F A C S) を用いてラット M S C とヒト M S C において評価した。M S C は、C D 2 9 (ベータ 1 - インテグリン)、C D 9 0 (T h y - 1)、及び C D 5 4 (I C A M - 1) を発現するが、C D 3 4 (造血幹細胞マーカー)、C D 1 1 b / c (マクロファージのマーカー)、及び v o n W i l l e b r a n d F a c t o r (ヒト内皮細胞のマーカー; データを示さず) を発現しなかった (図 1 4 a)。これは先の報告に一致する (3, 1 1)。同様の結果を免疫細胞化学的検査により得た (図 1 4 b ~ f)。ラット M S C とヒト M S C の両者からの脂肥形成、軟骨形成、及び骨形成分化は Pittenger et al. (1999) に記載された方法 (3) に従って確認された。これは、これらの細胞が間葉起源であることを示していた (データを示さず)。

実施例 7 : M S C に対する N I C D トランスフェクションの効果

N o t c h シグナリング活性は N o t c h タンパク質の細胞内ドメインに存在し、そしてその細胞外ドメインの欠失は N o t c h の構成的に活性な形態を顕出しうるので、N I C D を M S C 内にトランスフェクトした (1 6)。N I C D は、マウス N o t c h の細胞外ドメインの小さな断片をトランスメンブラン領域とそれに続く細胞内ドメインの全体をコードする配列から成る (1 7)。これは、Dr. Kawaichi, Nara Institute of Science and Technology により提供された。この断片を、p C I - n e o、C M V プロモーター含有哺乳動物発現ベクター内にサブクローニングし、そしてリポフ

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

エクシオン、その後のG418選択によりMSC内にトランスフェクトした。

N o t c hの細胞外ドメインと細胞内ドメインが検出されたので、非処理MSCは少量の内因性N o t c hを発現していた。しかしながら、N I C DがトランスフェクトされたMSCは、N I C Dだけが優勢に発現され、そして細胞外ドメインは検出されなかった（図15a）。

グルタメート・トランスポーターG L A S Tと3-ホスホグリセレート・デヒドロゲナーゼ（3 P G D H）は、神経幹細胞（N S C）、及び放射状グリア（r a d i a l g l i a）中に存在している（18, 19）。これは、系統的に、幹細胞に関係すると考えられ、そして胚形成の間のニューロンの源となることができる（20）。成体マウス海馬の歯状回内のプロモデオキシウリジン（B r d - U）陽性N S Cは3 P G D Hに対しほぼ不変的に免疫陽性であった（19）。N I C Dのトランスフェクション後、ラットMSCは上記分子の両者、並びにネスチン（n e s t i n）、N S C及び神経原細胞（neural progenitor cells (NPC)）の知られたマーカー（21）、の転写及び発現をアップレギュレートした。非処理MSCはG L A S T及び3 P G D Hの発現をほとんど示さなかったが、ひじょうに僅かな数の細胞がネスチンに対して陽性であった（ $0.74 \pm 0.1\%$ ）。しかしながら、それらは、N I C Dトランスフェクション後、G L A S T、3 P G D H、及びネスチン（ $4.92 \pm 1.0\%$, $p < 0.01$ ）をアップレギュレートした（図15b～g）。ルシフェラーゼ・プロモーター・アッセイは、5'-フランキング/全長（ヌクレオチド-3472～-1）、及び5'-フランキング/M1965（-1792～-1）3 P G D H活性が（両者は、放射性グリア及び神経上皮幹細胞内で活性であると報告

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

されている（１９）、ラットMSCにおいてNICDトランスフェクション後、有意に上昇したことを示した（ $p < 0.01$ ）（図15h）（プロモーターは、Dr. S. Furuya, Brain Science Institute, RIKENにより提供された）。

脊椎動物においては、NSCと神経堤（neural crest）幹細胞は、神経分化の阻害を通じてグリアの運命の採択を導く（13, 14, 16）。本発明者らは、ラットNSC内へのNICDの移入が、GFAP陽性星状細胞を生成することを確認したが、NICDトランスフェクトMSCにおいてはGFAP陽性細胞は僅かであることを発見した（データは示さず）。他方において、マウス前脳内への活性化Notch1の導入は、胚形成の間に放射状グリアの存在を促進すると報告されている（15）。MSCは、NICDの導入後、NSC及びNPCに関連するマーカーを発現したので、NICDトランスフェクションは、MSCがその表現型をNSC及び／又はNPCに類似の表現型に変えることを生じさせたと考えられる。

NICDトランスフェクトMSCにおける神経誘導

本発明者らは、いかなる条件が、NICDトランスフェクトMSCから神経細胞を選択的に作り出すために必要であるかについて調べた。このために、神経形成に作用するさまざまな因子（22）（ニューロトロフィン、白血病阻害因子、bFGF、及びCNTF）、及びフォルスコリンをテストした。本発明者らは、神経細胞の特別な誘導のための最も効率よい条件が、FSK、bFGF、及びCNTFの同時投入（本明細書の全体にわたり、「栄養因子導入」という。）であることを発見した。

ラットMSC内にNICDをトランスフェクトし、その後、細胞を60～70%集密まで培養し、3つの栄養因子（FSK+bFG

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

F + CNTF) を導入することにより、5日後に、(有糸分裂後ニューロンのマーカーとして知られる) MAP-2ab-陽性 $96.5 \pm 0.6\%$ がもたらされた(図16、図17a~d)。本発明者らは、bFGFだけで $73.2 \pm 5.1\%$ のMAP-2ab陽性率を、FSKとCNTFがさらに添加されたとき、それぞれ、 $87.5 \pm 3.1\%$ と $83.6 \pm 3.4\%$ の上記陽性率を達成した。但し、この差は有意ではない($p > 0.05$) (図16)。FSKとCNTFは単独では、 $29.2 \pm 5.4\%$ と $4.3 \pm 1.9\%$ を達成し($p < 0.01$)、そして両者合わせると $11.4\% \pm 2.4\%$ を達成した(図16)。

栄養因子によるMAP-2ab細胞の誘導は、非神経細胞を特異的に殺すことによるよりもむしろMSCからのグリアその他の細胞への分化を阻害することにより引き起こされるようであった。なぜなら、栄養因子導入後のTOTO-3核染色により死細胞はほとんど観察されなかったからである(データを示さず)。

栄養因子導入のみ、又はNICDを含まないpCI-neo対照ベクターの挿入後の栄養因子導入は、認識しうる神経表現型をもたらさなかった(図16)。それゆえ、NICDトランスフェクションは、MSCの神経細胞誘導にとって決定的であることが分かる。

MSC神経細胞の特徴付け

上記のラットMSC及びヒトMSCから誘導された神経細胞は、多数の結節状構造(varicosities)をもつ軸索様突起(neurite-like processes)を含むニューロンの特徴をもつ明確に区別される形態学的特徴を示し、そしてニューロフィラメント-M 3型ベクターチューブリン、及びTuJ1の如き典型的なニューロン・マーカーを発現した(図17a~g)。少しではあるが、nestin陽性細胞も認められた(2.0

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

3 ± 0.7 %) (データを示さず)。誘導された神経細胞は、トリプシン処理後に継代培養されるとき、増殖することができなかった。栄養因子導入から5日後に行ったBrd-U取り込みは、MAP-2 a b陽性細胞の標識化をほとんど示さなかった(図17h)。これは、上記神経細胞が有糸分裂を停止していることを示している。

MAP-2 a bは、非処理MSCにおいてWesternブロッティングにより検出されなかったが、栄養因子導入後に見られた(図17l(1))。

遅延直流カリウム電流の発展的上昇は、細胞興奮性の成熟と神経分化に関係している(23)。本発明者らは、電圧クランプ法を用いて、誘導された神経細胞におけるこの特性を調べた。外側に向かう直流K⁺電流は、ラットとヒトの両者に由来する誘導MSCにおいて正電圧ステップにより顕出された。この電流の大きさは、非処理MSC(図17m~q)における電流よりも劇的に高かった。本発明者らは、細胞全体の形が形成された直後に、電流クランプ条件下で休止膜電位を調べた。休止膜電位は、非処理MSCにおける電位よりも神経細胞間でより低かった(それぞれ、-30~-40mVと-50~-60mV)。MSCにおいて誘導された神経生理学的特性は、成熟ニューロンのものに似ている。

グリア細胞を調べるために、本発明者らは、アストロサイトのマーカーとしてGFAPを、そしてオリゴデンドロサイトのマーカーとしてガラクトセレブロシド(GalC)とO4を使用して、免疫細胞化学的分析を実施した。上記マーカーに陽性なグリア細胞は、ラット又はヒトMSCの栄養因子導入後には検出されなかった(図17i~k)。これは、ウェスタン・ブロッティング法より確認された(図17l(2))。神経誘導の特異性を確認するために、本

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

発明者らは、Neuro DとGFAPのプロモーター活性を計測した。非処理ラットMSCにおいては、Neuro DとGFAPは、それぞれ、 67.2 ± 15.3 と 5.16 ± 1.36 であった。しかしながら、栄養因子導入後、Neuro D活性は、 132.7 ± 20.9 に有意に上昇し、一方、GFAPは、 0.63 ± 0.22 に低下した（図18）。上記結果は、神経細胞だけが、栄養因子導入後に、NICDトランスフェクトMSCから特異的に誘導されたことを示している。

TH陽性細胞の生成

神経の働きは、細胞型に特異的な神経伝達物質に密に関連する。それゆえ、本発明者らは、栄養因子導入後に、神経伝達物質及び関連タンパク質の免疫細胞学的検査を実施した（図19a）。GDNFは、中脳ドーパミン作動性ニューロンの生成及び発達に関連することが知られている（36）。本発明者らは、GDNFの投与が、神経MSCを誘導してチロシン・ヒドロキシラーゼ（TH）陽性細胞の割合を高めるかどうかについても調べた。この割合は、栄養因子のみ導入後の $3.9 \pm 0.6\%$ から、GDNFの投与後の $41.0 \pm 14.1\%$ まで、上昇した（図19a～c）。GDNFはNurr-1発現をも誘導した。Nurr-1は、中脳前駆体からドーパミン作動性ニューロンへの分化において役割を演じる転写因子である（37）（図19d）。ウェスタン・ブロッティングにより、上記の結果をさらに確認した（図19e）。

パーキンソン病のモデル・ラットへの神経細胞の移植

MSC誘導神経細胞がインビボにおいて生存し、かつ、機能する能力を調べるために、ラット細胞とヒト細胞の両者を、パーキンソン病モデル・ラットに移植した。内側前駆体内への6-OHDAの片側性投与は、黒質内のドーパミン作動性ニューロンを選択的に破

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

壊し、それによりパーキンソン病の有用なモデルを提供する。緑色蛍光タンパク質 (GFP) (4) により標識された3つのタイプラットMSCを移植した: 1) 非処理 (MSC群)、2) 栄養因子による神経細胞への誘導後 (N-MSC群)、3) 誘導後のGDNF投与 (G-MSC群)。動物に、上記病変線状体に対し同側に、 1×10^5 MSCを移植した。アポモルフィン誘導回転挙動を細胞移植から10週間後に調べた。MSC群は、上記病変側から離れるような回転バイアスを示し、これは持続した。一方、N-MSC群は時間の経過とともに僅かな回復を示した。これに対し、G-MSC群は、回転挙動からの有意な回復を示した (図19f)。移植された動物は16週まで追跡されたが、脳内に腫瘍形成は観察されなかった。

移植から10週間後、免疫組織化学を含む組織学的方法により脳を検査した。移植された線状体は、GFD陽性細胞を示した。一方、移植された細胞は、ニューロフィラメントについて陽性であり、そして2~3のケースにおいて、抗-GFAP又は抗-O4抗体により標識された。また、移植された細胞の多くは、TH及びドーパミン・トランスポーター (DAT) について陽性であった (図19g~k)。GFP標識MSCの中のGFAP陽性細胞のパーセンテージは、 $2.5 \pm 1.4\%$ であった。一方、THとDAT陽性細胞のパーセンテージは、それぞれ、 $45.7 \pm 4.2\%$ と $30.7 \pm 0.9\%$ であった。G-MSC群の一連の切片内で、移植された細胞は、宿主の線状体内に移動し、そして延びていた (図19l)。約 3.4×10^4 (34%) の細胞が線状体内でカウントされた。

ヒトGDNF処理神経MSCを、6-OHDA病変ラットの線状体内に、上記と同様にして移植した。動物を、毎日、FK 506で免疫抑制し、そして回転挙動を4週間後に記録した。移植は、

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

回転挙動において有意な改善をもたらした（術前後の、平均回転指数は、 0.44 ± 0.2 であった）（図19m）。移植されたMSCがドーパミンを合成し、そして放出する能力を、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）により、移植された脳のスライスの、培養基中のドーパミン濃度を計測することにより評価した。脳のスライスを、中央線で、移植された側と無傷の側に分け、そして別々に培養した。各側からの培養基中のドーパミン濃度を計測し、そして病変側対無傷側の比を計算した。偽手術ラットは、 0.57 ± 0.01 （ $n = 3$ ）の比を示した。これに対して、移植された動物の比は、 0.67 ± 0.04 （ $n = 3$ ）であった。これは、移植によるドーパミン放出増大（ $p = 0.04$ ）といえる。上記の結果は、ヒトMSCから誘導された神経細胞が、病変化されたラット線状体内でドーパミンを合成し、かつ、放出することができたことを示している。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

参考文献

1. Bishop, A.E., Buttery, L.D. & Polak, J.M. Embryonic stem cells (Review). J. Pathol. 197, 424-429 (2002).
2. Weissman, I.L. Stem cells : units of development, units of regeneration, and units in evolution (Review). Cell 100, 157-168 (2000).
3. Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147 (1999).
4. Dezawa, M. et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. Eur. J. Neurosci. 14, 1771-1776 (2001).
5. Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418, 41-49 (2002).
6. Eglitis, M.A., Dawson, D., Park, K.W. & Mouradian, M.M. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. Neuroreport 10, 1289-1292 (1999).
7. Kopen, G.C., Prockop, D.J. & Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 10711-10716 (1999).
8. Terada, N. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 416, 542-545 (2002).
9. Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L. & Weissman, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 297, 2256-2259 (2002).

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

10. Woodbury, D. , Schwarz, E.J. , Prockop, D.J. & Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J. Neurosci. Res. 61, 364-370 (2000).
11. Kohyama, J. et al. Brain from bone : efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 68, 235-244 (2001).
12. Sanchez-Ramos, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J. Neurosci. Res. 69, 880-893 (2002).
13. Lundkvist, J. & Lendahl, U. Notch and the birth of glial cells (Review). Trends Neurosci. 24, 492-494 (2001).
14. Morrison, S.J. et al. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. Cell 101, 499-510 (2000).
15. Gaiano, N. , Nye, J.S. & Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. Neuron 26, 395-404 (2000).
16. Nye, J.S. , Kopan, R. & Axel, R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. Development 120, 2421-2430 (1994).
17. Yamamoto, N. et al. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. J. Biol. Chem. 276, 45031-45040 (2001).
18. Shibata, T. et al. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

se spinal cord. J. Neurosci. 17, 9212-9219 (1997).

19. Yamasaki, M. et al. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. J. Neurosci. 21, 7691-7704 (2001).

20. Gregg, C.T., Chojnacki, A.K. & Weiss, S. Radial glial cells as neural precursors : the next generation? J. Neurosci. Res. 69, 708-713 (2002).

21. Roy, N.S. et al. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat. Med. 6, 271-277 (2000).

22. Ip, N.Y. The neurotrophins and neuropoietic cytokines : two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells (Review). Ann. N.Y. Acad. Sci. 840, 97-106 (1998).

23. Grosse, G. et al. Expression of Kvl potassium channels in mouse hippocampal primary cultures : development and activity-dependent regulation. J. Neurosci. 20, 1869-1882 (2000).

24. Morrison, S.J. Neural differentiation : proneural genes inhibit gliogenesis (Review). Curr. Biol. 11, R349-351 (2001).

25. Sun, Y. et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. Cell 104, 365-376 (2001).

26. Ishibashi, M. et al. Persistent expression of helix-lo

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

op-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* 13, 1799-1805 (1994).

27. Furukawa, T. et al. *Notch1*, *Hes1*, and *Notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394 (2000).

28. Seidel, H.M., Lamb, P. & Rosen, J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway (Review). *Oncogene* 19, 2645-2656 (2000).

29. Burdon, T., Smith, A. & Savatier, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12, 432-438 (2002).

30. Nakashima, K. et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 5868-5873 (2001).

31. Stork, P.J. & Schmitt, J.M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258-266 (2002).

32. Neufeld, B. et al. Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 275, 20239-20242 (2000).

33. Shimazaki, T., Shingo, T. & Weiss, S. The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 21, 7642-7653 (2001).

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

34. Kurooka, H., Kuroda, K. & Honjo, T. Roles of the ankyr in repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res.* 26, 5448-5455 (1998).

35. Franklin, J.L. et al. Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Deltal. *Curr. Biol.* 9, 1448-1457 (1999).

36. Akerud, P. et al. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 73, 70-78 (1999).

37. Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T.D. & Gage, F.H. Nurrl, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126, 4017-4026 (1999).

38. Kim, J.H. et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50-56 (2002).

39. Weinmaster, G., Roberts, V.J. & Lemke, G. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205 (1991).

40. Peyton, M. et al. BETA3, a novel helix-loop-helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 626-33 (1996).

41. Rozovsky, I. et al. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology* 143, 636-646 (2

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

002).

42. Seta, Y., Toyono, T., Takeda, S. & Toyoshima, K. Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation. FEBS Lett. 444, 43-46 (1999).

43. Schwaiger, F.W. et al. Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). Eur. J. Neurosci. 12, 1165-1176 (2000).

44. Kawasaki, H. et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron 28, 31-40 (2000).

45. Tanaka, H. et al. Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. Neuroreport 10, 631-634 (1999).

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

請 求 の 範 囲

1. 骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞又は骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、上記細胞内にN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入することを含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法。

2. 骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経前駆細胞を得る方法であって、以下のステップ：

(1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；及び

(2) 上記細胞内にN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養して神経前駆細胞を得る；

を含む、前記分化・誘導方法。

3. 前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である、請求項2に記載の方法。

4. 請求項2又は3に記載の方法により製造された神経前駆細胞。

5. 神経前駆細胞マーカー、G L A S T、3 P G D H、及びネスチンを発現する神経前駆細胞。

6. 骨髄間質細胞をインビトロにおいて神経細胞に分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

(1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

(2) 上記細胞内にN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；

及び

(3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のN o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法。

7. 前記標準的な基礎培地がイーグルス (E a g l e' s) アルファ修飾最小必須培地である、請求項6に記載の方法。

8. 前記血清がウシ胎児血清である、請求項6に記載の方法。

9. 前記N o t c h遺伝子及び／又はN o t c hシグナリング関連遺伝子の導入が、哺乳動物発現ベクターを用いたリポフェクションによる、請求項6に記載の方法。

10. 前記ステップ(2)と(3)の間に、前記遺伝子が導入された細胞の選択を所定期間行うステップをさらに含む、請求項6に記載の方法。

11. 前記サイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログが、フォルスコリン (F o r s k o l i n) である、請求項6に記載の方法。

12. 前記サイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度が、0.001nM~100μMである、請求項6に記載の方法。

13. 前記細胞分化生存作用性因子が、塩基性線維芽細胞成長因

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

子 (basic-Fibroblast growth factor (bFGF))、毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor (CNTF))、及びそれらの混合物から成る群から選ばれる、請求項6に記載の方法。

14. 前記細胞分化生存作用性因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項6に記載の方法。

15. 前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である、請求項6～14のいずれか1項に記載の方法。

16. 請求項6～14のいずれか1項に記載の方法により製造された神経細胞。

17. 請求項15に記載の方法により製造された神経細胞。

18. 神経細胞マーカー、3型 β -チューブリン (β -tubulin isotype 3)、及びTuJ-1を発現する神経細胞。

19. 骨髄間質細胞をインビトロにおいてドーパミン作動性ニューロンに分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- (3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得；
- (4) ステップ(3)において得られた神経細胞を、標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で培養し；及び
- (5) グリア由来神経栄養因子 (Glial derived

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

neurotrophic factor (GDNF)
)、及びサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリ
ックAMPアナログ、及び／又は上記グリア由来神経栄
養因子以外の細胞分化生存作用性因子を、上記培養液に
添加し、そしてさらに培養して、ドーパミン作動性ニュー
ロンを得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導されたドーパミン作
動性ニューロンが、上記のNotch遺伝子及び／又はNotch
シグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した
結果として得られたものである、前記分化・誘導方法。

20. 前記ステップ(4)における標準的な基礎培地が、イーグ
ルス(Eagle's)アルファ修飾最小必須培地である、請求項
19に記載の分化・誘導方法。

21. 前記ステップ(4)における血清はウシ胎児血清である、
請求項19に記載の方法。

22. 前記ステップ(5)におけるサイクリックAMP上昇作用
性剤又はサイクリックAMPアナログは、フォルスコリン(Fors
skolin)である、請求項19に記載の方法。

23. 前記ステップ(5)におけるサイクリックAMP上昇作用
性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度が、0.001nM～
100μMである、請求項19に記載の方法。

24. 前記ステップ(5)における、グリア由来神経栄養因子以
外の細胞分化生存作用性因子が、塩基性線維芽細胞成長因子(ba
sic-Fibroblast growth factor(b
FGF))、血小板由来成長因子(platelet-deriv
ed growth factor-AA(PDGF-AA))、
及びそれらの混合物から成る群から選ばれる、請求項19に記載の

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

方法。

25. 前記ステップ(5)におけるグリア由来神経栄養因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項19に記載の方法。

26. 前記ステップ(5)におけるグリア由来神経栄養因子の濃度が、 $1 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ ng/ml}$ である、請求項25に記載の方法。

27. 前記ステップ(5)における、グリア由来神経栄養因子以外の細胞分化生存作用性因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項19に記載の方法。

28. 前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である、請求項19～27のいずれか1項に記載の方法。

29. 請求項19～27のいずれか1項に記載の方法により製造されたドーパミン作動性ニューロン。

30. 請求項28に記載の方法により製造されたドーパミン作動性ニューロン。

31. 骨髄間質細胞をインビトロにおいてアセチルコリン作動性ニューロンに分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記細胞内にNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- (3) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養して神経細胞を得；
- (4) ステップ(3)において得られた神経細胞を、標準的な

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

基礎培地に血清を加えた培地中で培養し；及び

- (5) 神経成長因子 (N e r v e g r o w t h f a c t o r) (NGF)、及びサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログ、及び／又は上記神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子を、上記培養液に添加し、そしてさらに培養して、アセチルコリン作動性ニューロンを得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導されたアセチルコリン作動性ニューロンが、上記のN o t c h 遺伝子及び／又はN o t c h シグナリング関連遺伝子が導入された骨髓間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法。

32. 前記ステップ(4)における標準的な基礎培地が、イーグルス (E a g l e ' s) アルファ修飾最小必須培地である、請求項31に記載の方法。

33. 前記ステップ(4)における血清がウシ胎児血清である、請求項31に記載の方法。

34. 前記ステップ(5)におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログが、フォルスコリン (F o r s k o l i n) である、請求項31に記載の方法。

35. 前記ステップ(5)におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度が、0.001 nM～100 μ Mである、請求項31に記載の方法。

36. 前記ステップ(5)における、神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子が、塩基性線維芽細胞成長因子 (b a s i c - F i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r (bFGF))、血小板由来成長因子 (p l a t e l e t - d e r i v e d g r o w t h f a c t o r - A A (PDGF-AA))、及びそれら

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

の混合物から成る群から選ばれる、請求項 31 に記載の方法。

37. 前記ステップ (5) における神経成長因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項 31 に記載の方法。

38. 前記ステップ (5) における神経成長因子の濃度が、 $1 \text{ ng/ml} \sim 100 \text{ ng/ml}$ である、請求項 37 に記載の方法。

39. 前記ステップ (5) における、神経成長因子以外の細胞分化生存作用性因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項 31 に記載の方法。

40. 前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である、請求項 31～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

41. 請求項 31～39 のいずれか 1 項に記載の方法により製造されたアセチルコリン作動性ニューロン。

42. 請求項 40 に記載の方法により製造されたアセチルコリン作動性ニューロン。

43. 骨髄間質細胞をインビトロにおいて骨格筋細胞に分化・誘導する方法であって、以下のステップ：

- (1) 骨髄から骨髄間質細胞を単離し、そして標準的な基礎培地に血清を加えた培地中で上記細胞を培養し；
- (2) 上記培養液に脱メチル化剤を添加し、そしてさらに培養し；
- (3) サイクリック AMP 上昇作用性薬剤又はサイクリック AMP アナログ、及び／又は細胞分化生存作用性因子を上記培養液に添加し、そしてさらに培養し；
- (4) 上記細胞内に *Notch* 遺伝子及び／又は *Notch* シグナリング関連遺伝子を導入し、そしてさらに培養し；
- (5) 上記の遺伝子導入された細胞と、遺伝子導入のされてい

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

ない無処理の上記骨髄間質細胞とを共培養し；及び

(6) サイクリックAMP上昇作用性薬剤又はサイクリックAMPアナログを上記培養液に添加し、そしてさらに培養して骨格筋細胞を得る；

を含み、ここで、最終的に得られた分化・誘導された細胞が、上記のNotch遺伝子及び／又はNotchシグナリング関連遺伝子が導入された骨髄間質細胞が細胞分裂した結果として得られたものである、前記分化・誘導方法。

44. 前記標準的な基礎培地がイーグルス (Eagle's) アルファ修飾最小必須培地である、請求項43に記載の方法。

45. 前記血清がウシ胎児血清である、請求項43に記載の方法。

46. 前記脱メチル化剤が5-アザシチジン (5-azacytidine) である、請求項43に記載の方法。

47. 前記5-アザシチジンの濃度が30nmol/l～300μmol/lである、請求項43に記載の方法。

48. 前記ステップ(3)におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログが、フォルスコリン (Forskolin) である、請求項43に記載の方法。

49. 前記ステップ(3)におけるサイクリックAMP上昇作用性剤又はサイクリックAMPアナログの濃度が、0.001nM～100μMである、請求項43に記載の方法。

50. 前記細胞分化生存作用性因子が、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic-Fibroblast growth factor (bFGF))、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA))、ヘレグリン (Heregulin)、及びそれらの混合物

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

から成る群から選ばれる、請求項 43 に記載の方法。

51. 前記細胞分化生存作用性因子の濃度が、 $0.001 \text{ ng/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項 43 に記載の方法。

52. 前記 *Notch* 遺伝子及び／又は *Notch* シグナリング関連遺伝子の導入が、哺乳動物発現ベクターを用いたリポフェクションによる、請求項 43 に記載の方法。

53. 前記ステップ (4) と (5) の間に、前記遺伝子が導入された細胞の選択を所定期間行うステップをさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

54. 前記ステップ (5) におけるサイクリック AMP 上昇作用性剤又はサイクリック AMP アナログが、フォルスコリン (*Forskolin*) である、請求項 43 に記載の方法。

55. 前記ステップ (5) におけるサイクリック AMP 上昇作用性剤又はサイクリック AMP アナログの濃度が、 $0.001 \text{ nM} \sim 100 \mu\text{M}$ である、請求項 43 に記載の方法。

56. 前記の単離された骨髄間質細胞がヒト細胞である、請求項 43 ～ 55 のいずれか 1 項に記載の方法。

57. 請求項 43 ～ 55 のいずれか 1 項に記載の方法により製造された骨格筋細胞。

58. 請求項 56 に記載の方法により製造された骨格筋細胞。

59. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項 4 に記載の神経前駆細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで、上記神経前駆細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療に効果を発揮する、前記治療方法。

60. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項 4 に記載の神経前駆細胞

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

の使用。

6 1. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項 5 に記載の神経前駆細胞の使用。

6 2. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項 1 7 に記載の神経細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法。

6 3. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項 1 7 に記載の神経細胞の使用。

6 4. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項 1 8 に記載の神経細胞を、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法。

6 5. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項 1 8 に記載の神経細胞の使用。

6 6. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項 3 0 に記載のドーパミン作動性ニューロンを、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法。

6 7. 前記疾患、障害又は症状が、パーキンソン病である、請求項 6 6 に記載の方法。

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

68. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項30に記載のドーパミン作動性ニューロンの使用。

69. 前記疾患、障害又は症状が、パーキンソン病である、請求項68に記載の使用。

70. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項42に記載のアセチルコリン作動性ニューロンを、上記患者の中枢神経系内の神経疾患、障害又は症状部位に投与することを含み、ここで上記神経細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法。

71. 前記疾患、障害又は症状が、ALS（筋萎縮性側索硬化症）及びアルツハイマー病から成る群から選ばれる、請求項70に記載の方法。

72. 中枢神経疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項42に記載のアセチルコリン作動性ニューロンの使用。

73. 前記疾患、障害又は症状が、ALS及びアルツハイマー病から成る群から選ばれる、請求項72に記載の使用。

74. 変性性筋肉疾患、障害又は症状をもつ患者の治療方法であって、治療的有効量の請求項58に記載の骨格筋細胞を、上記患者の筋肉変性部位に投与することを含み、ここで上記骨格筋細胞の存在が、上記疾患、障害又は症状の治療的効果を発揮する、前記治療方法。

75. 前記疾患、障害又は症状が筋ジストロフィーである、請求項74に記載の方法。

76. 変性性筋肉疾患、障害又は症状をもつ患者の治療用医薬組成物の製造における、治療的有効量の請求項58に記載の骨格筋細

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

胞の使用。

77. 前記疾患、障害又は症状が筋ジストロフィーである、請求項76に記載の使用。

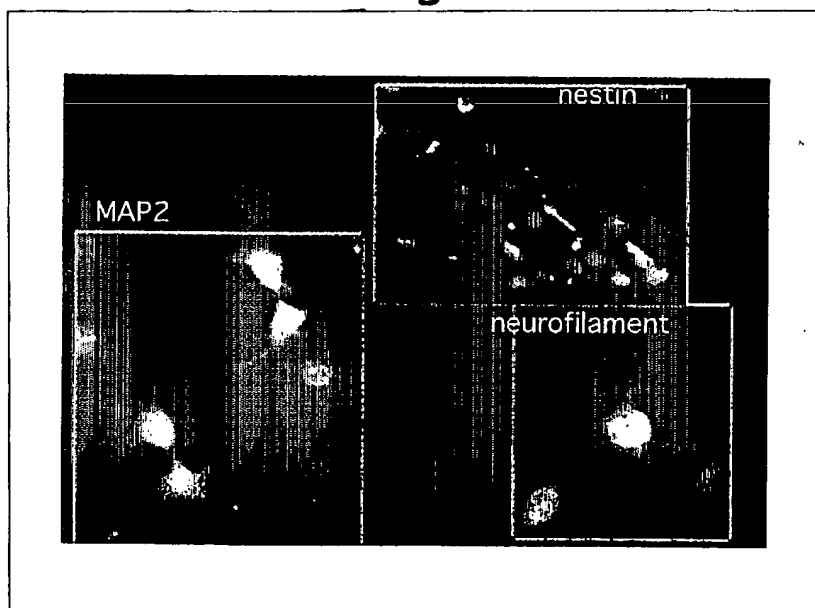
WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.1



Fig.2



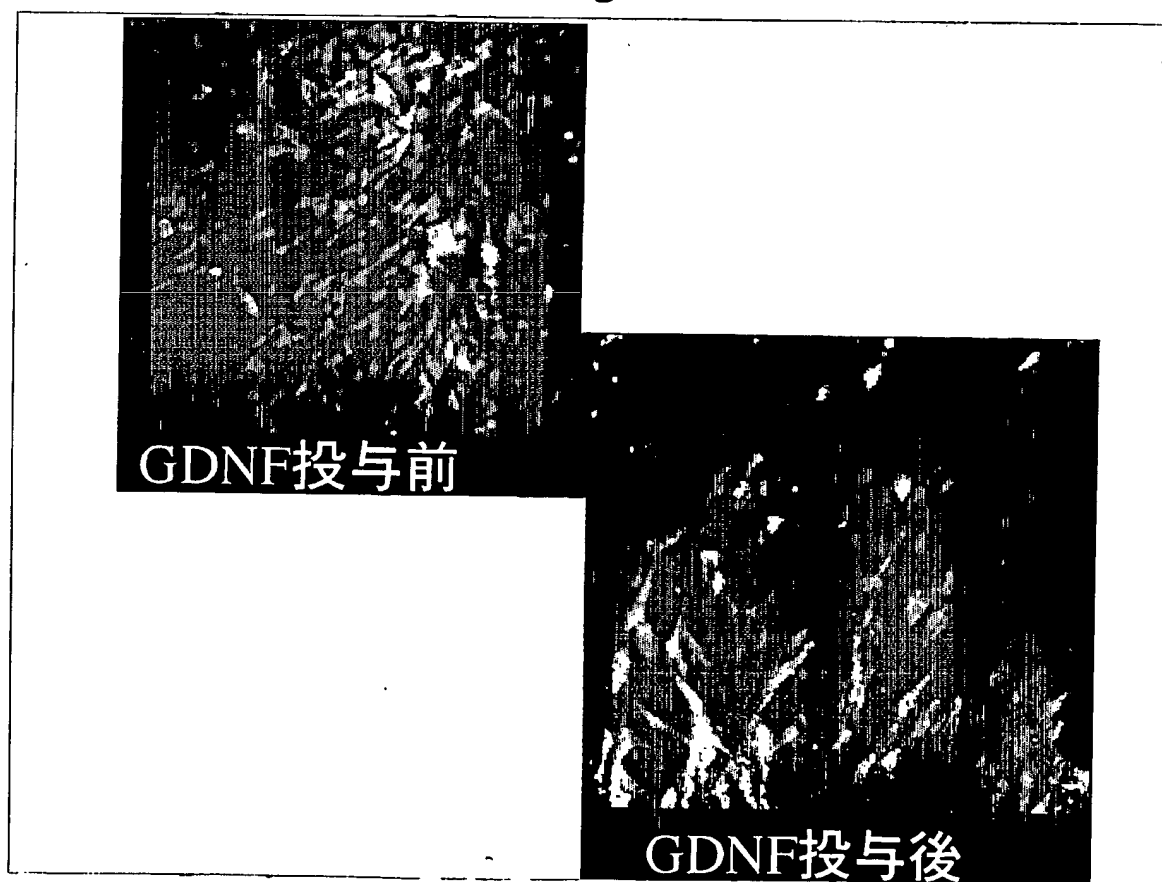
WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.3



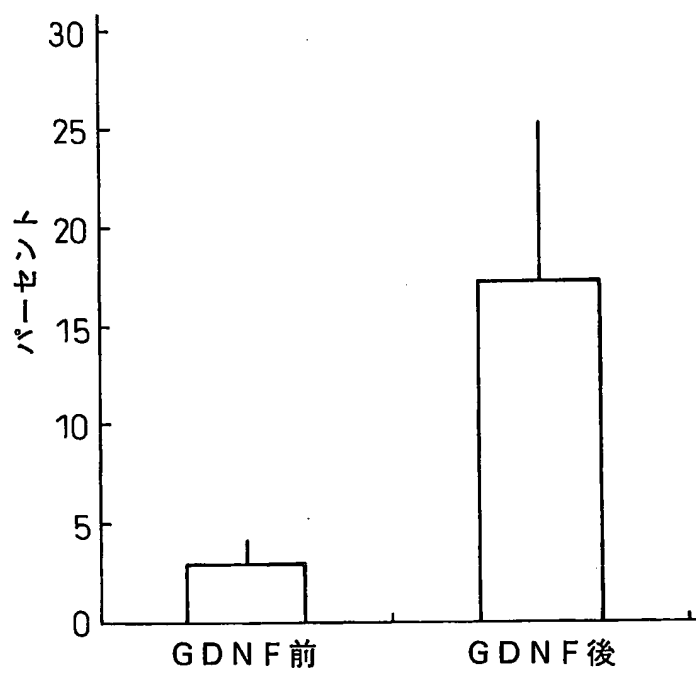
Fig.4



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

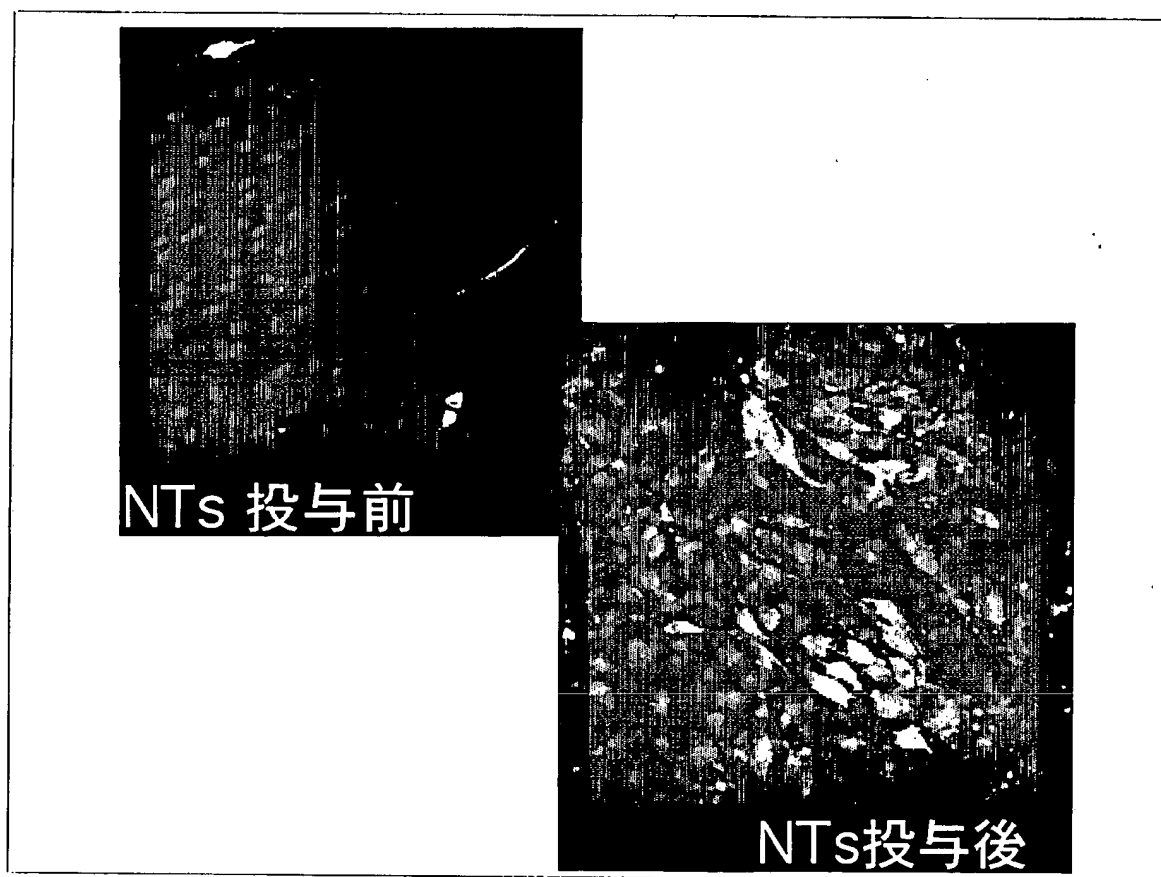
Fig.5



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

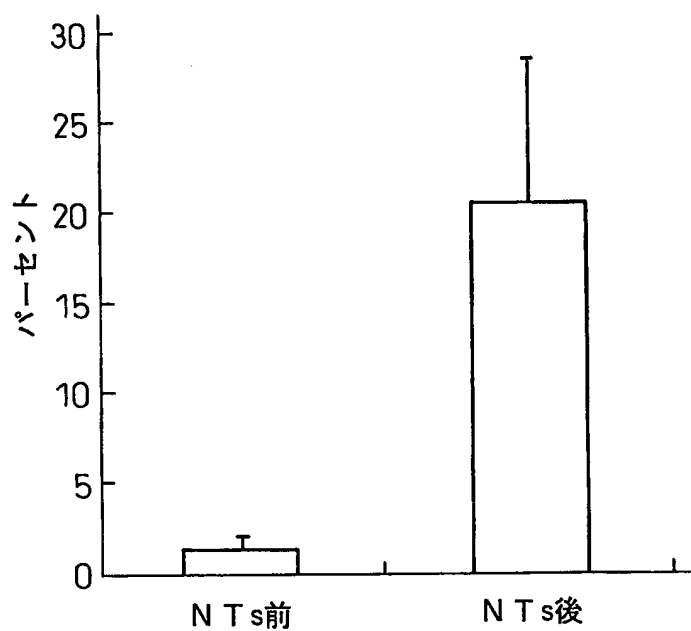
Fig.6



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.7



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.8

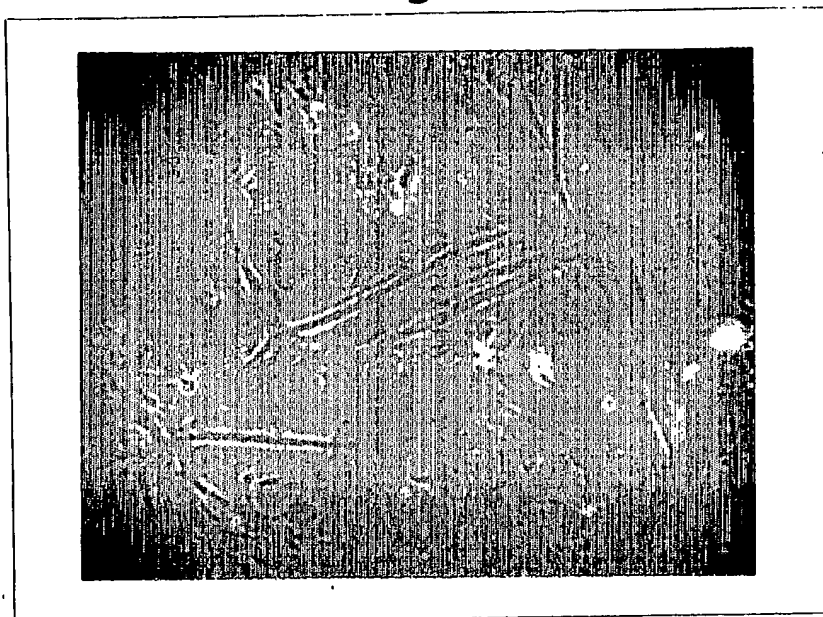
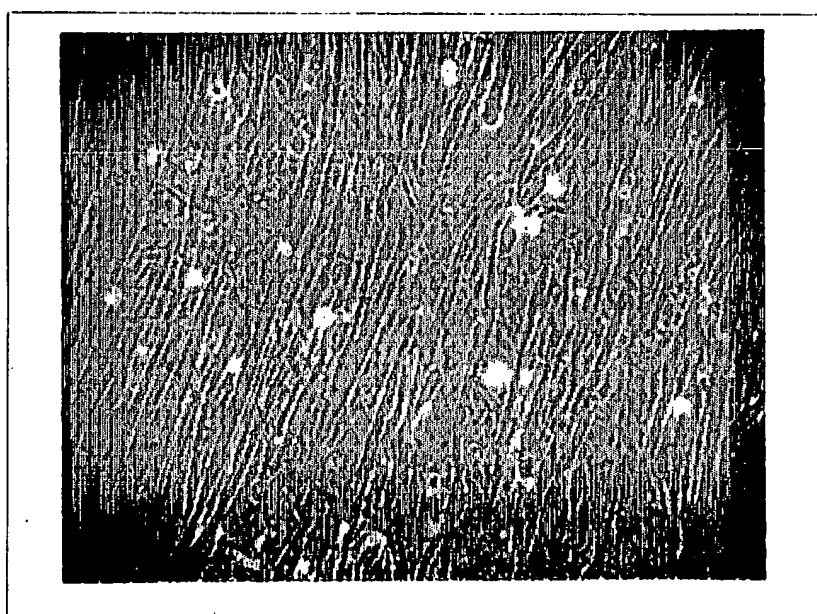


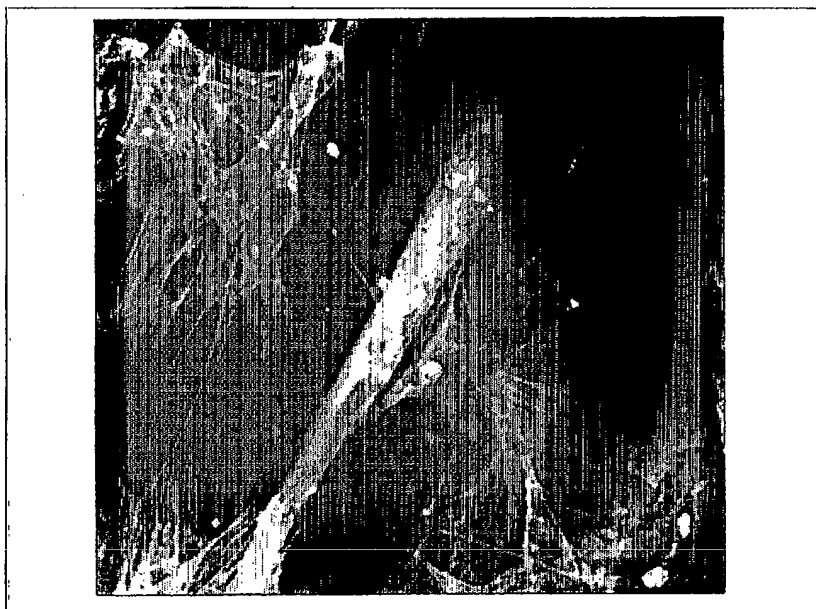
Fig.9



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

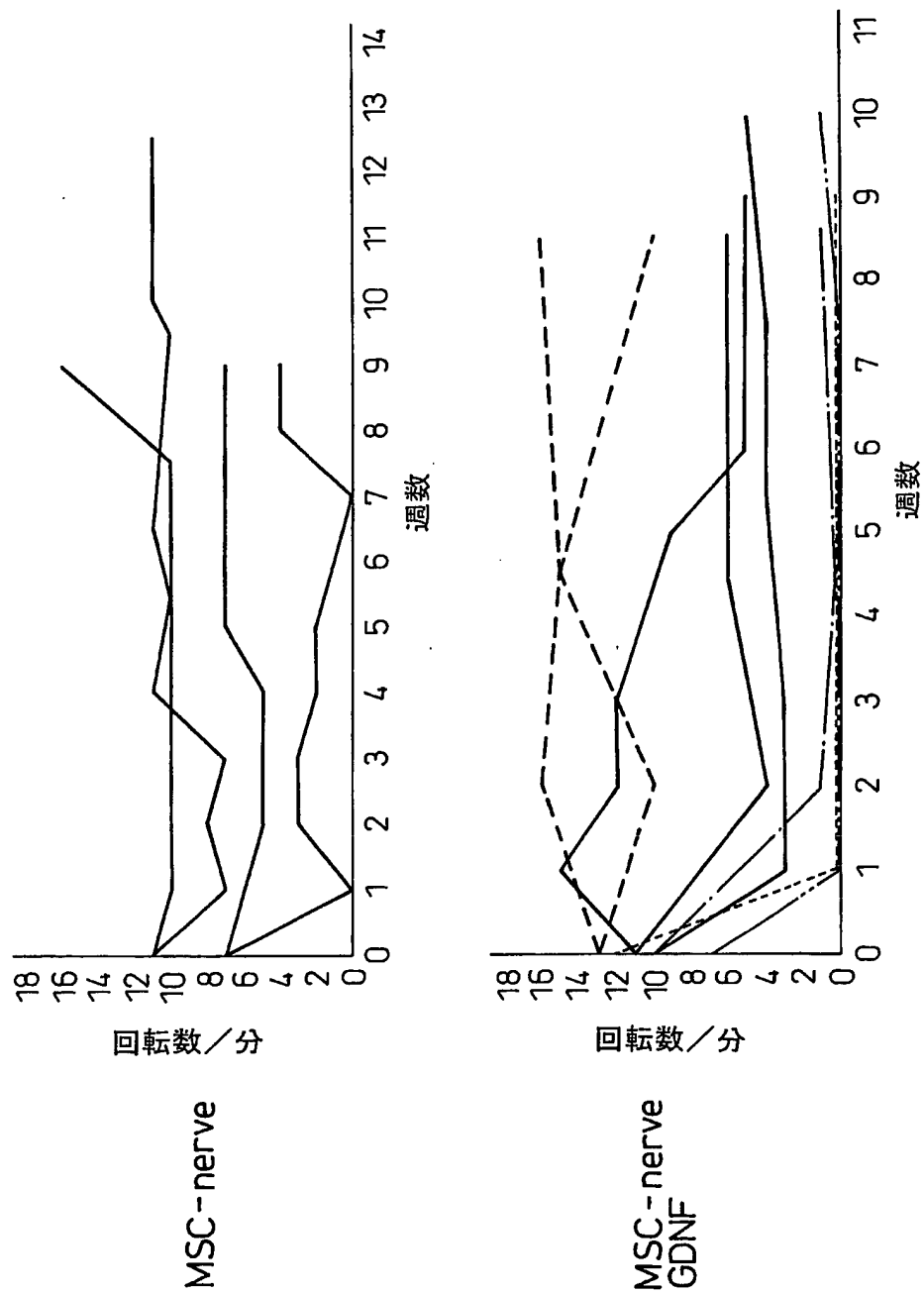
Fig.10



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

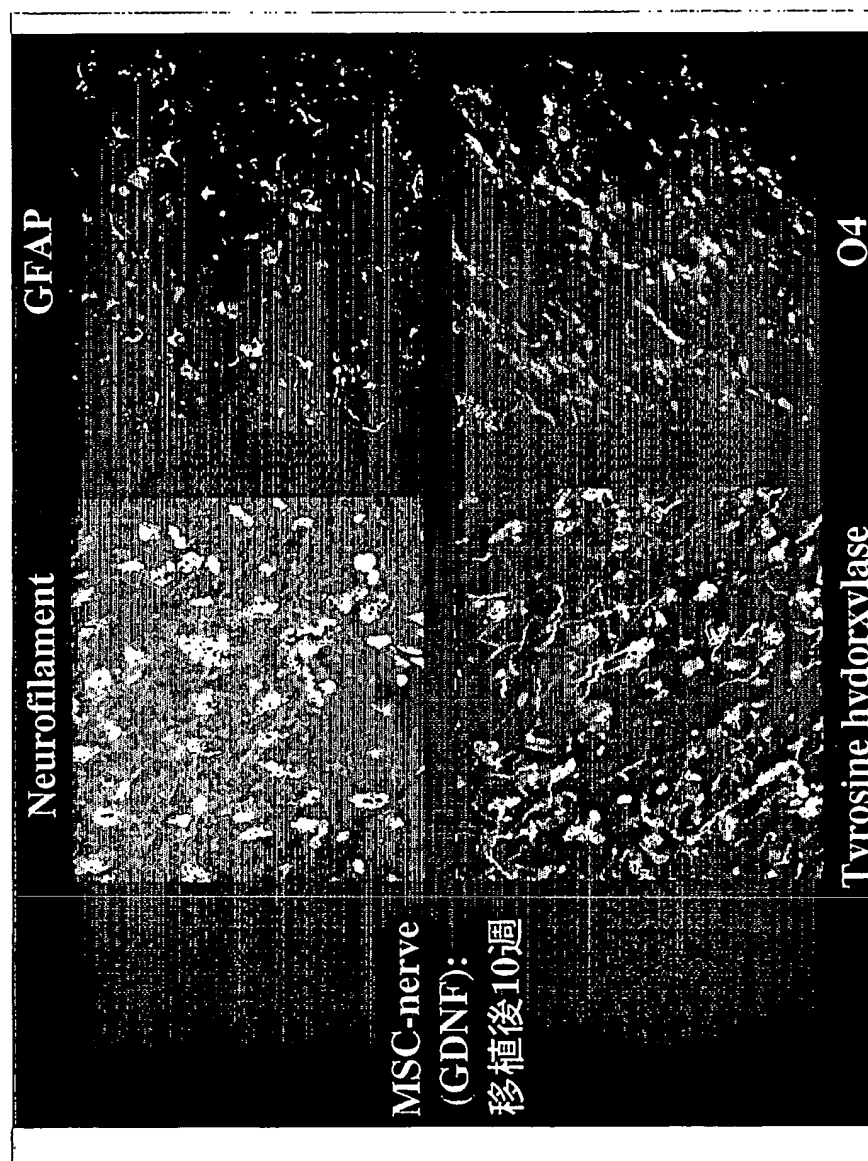
Fig.11



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

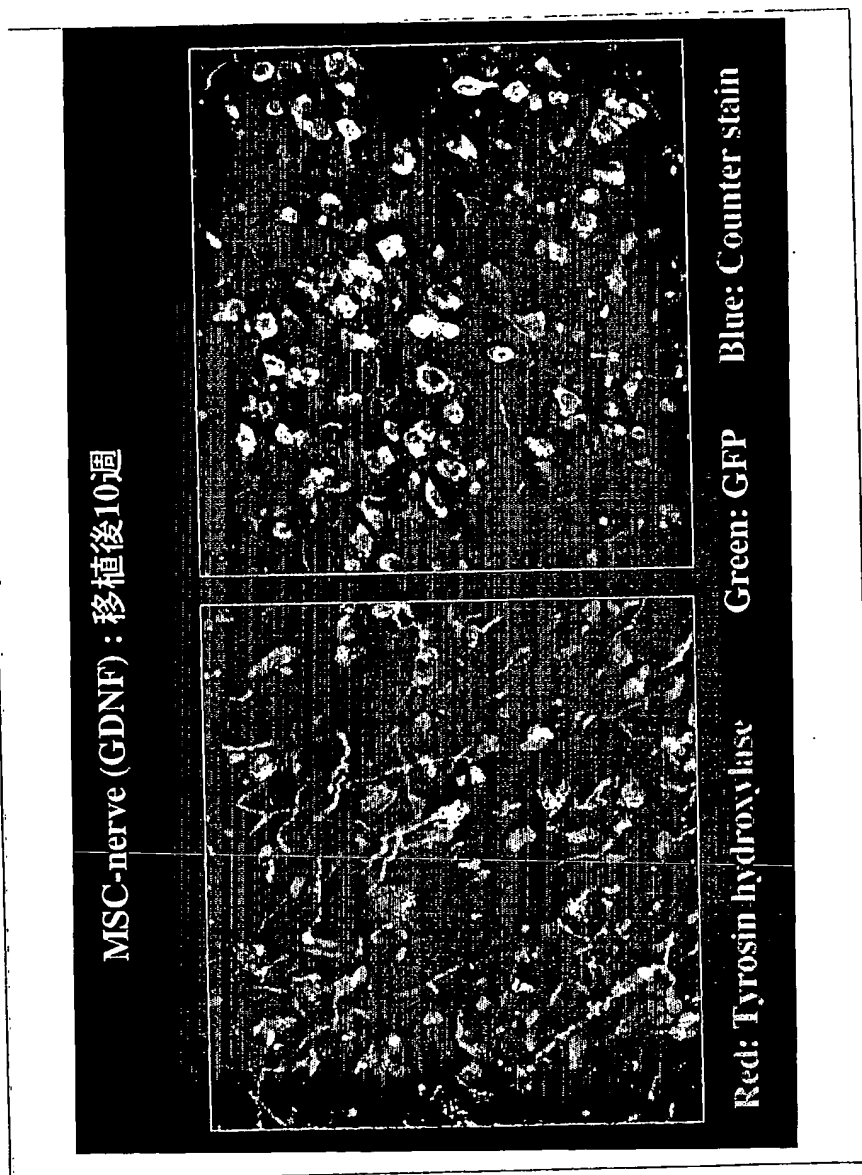
Fig.12



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.13



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

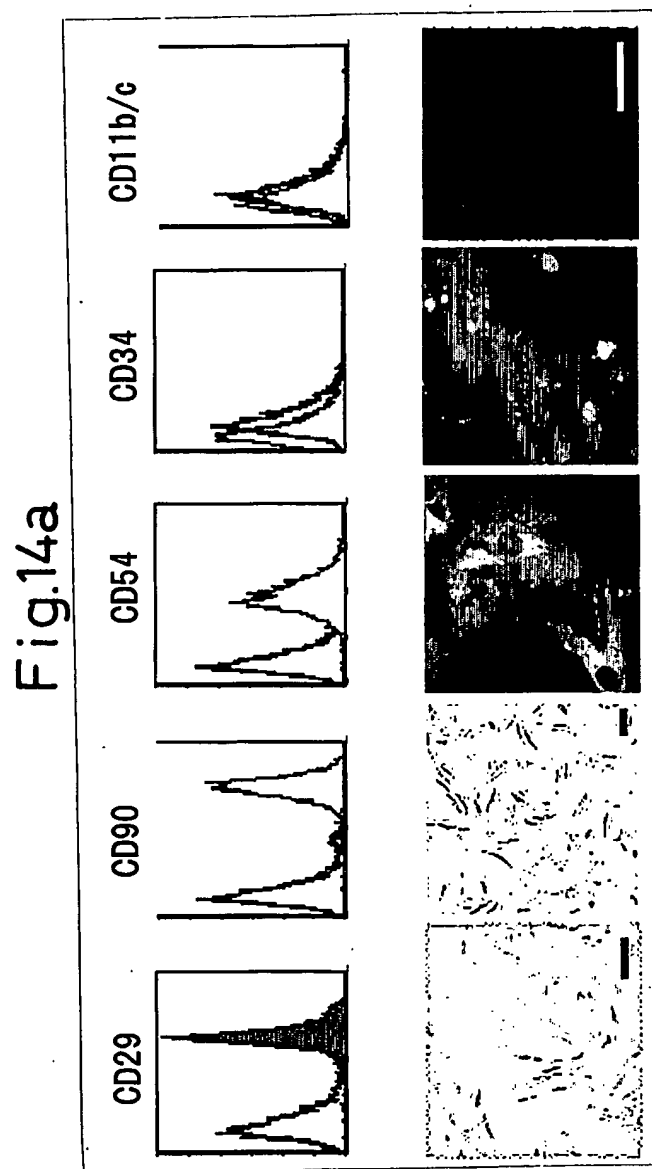


Fig.14b Fig.14c Fig.14d Fig.14e Fig.14f

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.15a

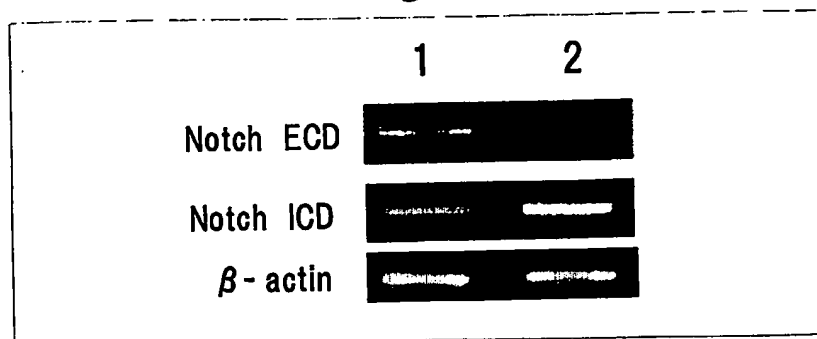


Fig.15b

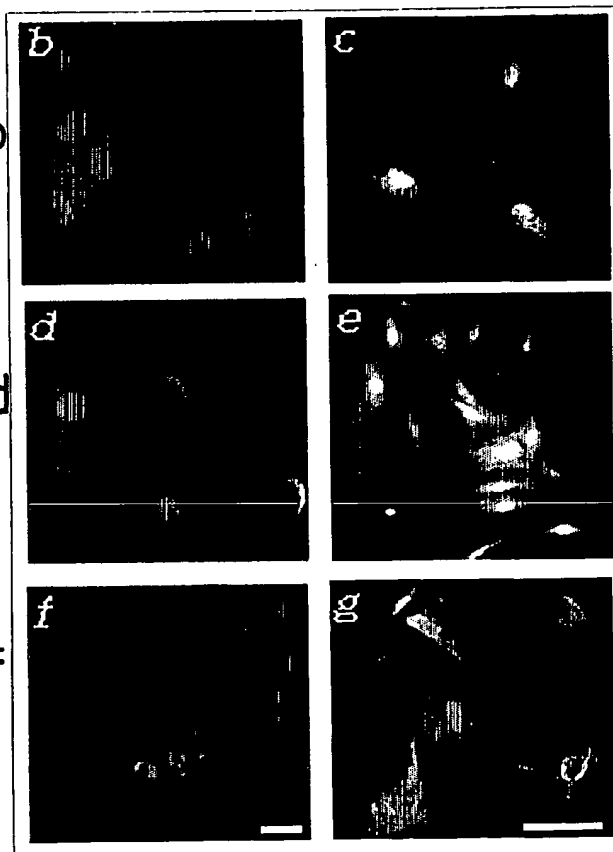


Fig.15c

Fig.15d

Fig.15e

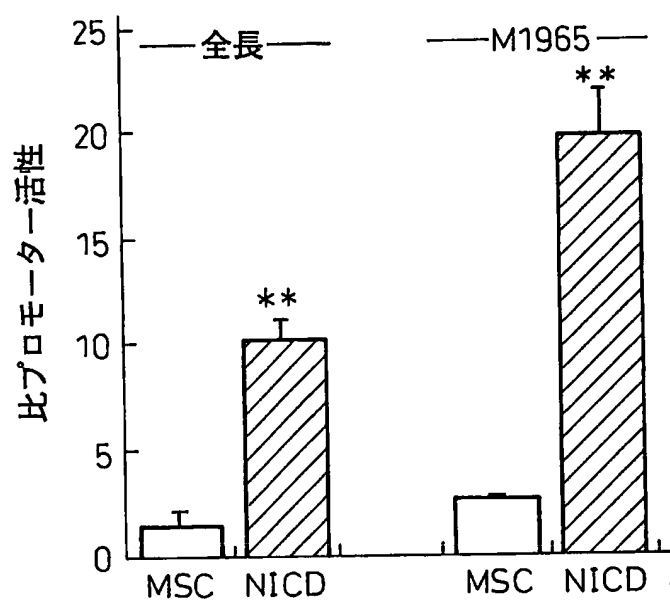
Fig.15f

Fig.15g

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

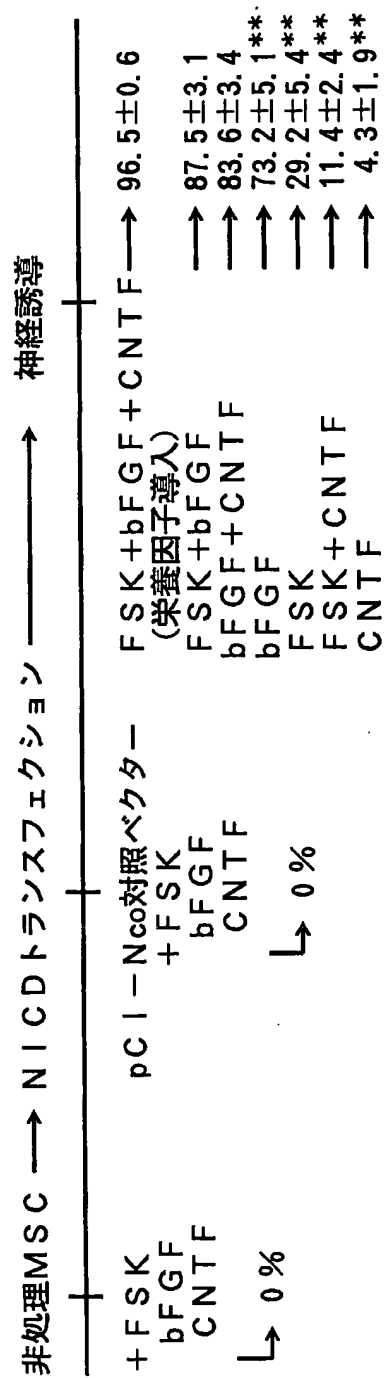
Fig.15h



WO 03/066856

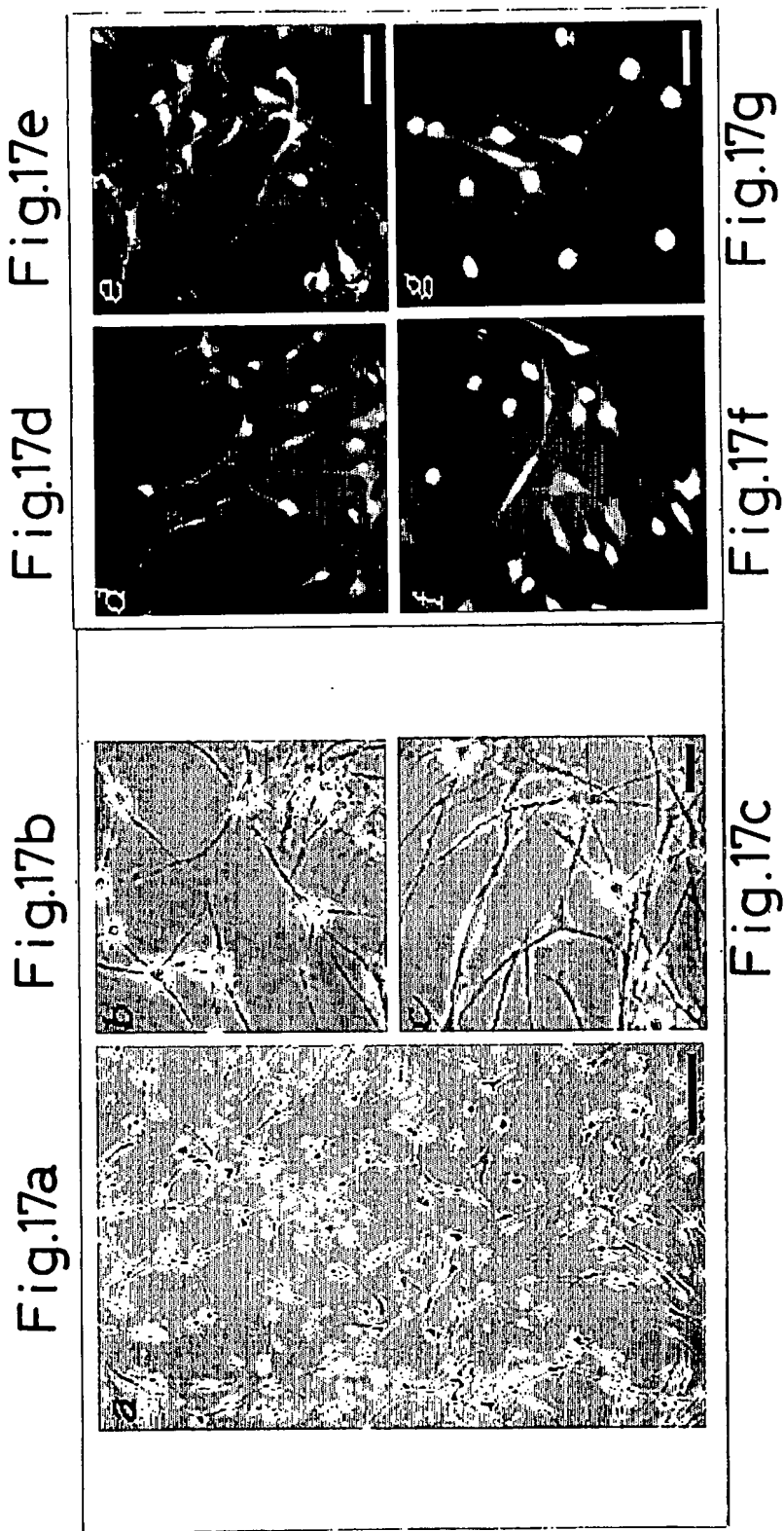
PCT/JP03/01260

Fig.16



WO 03/066856

PCT/JP03/01260



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.17h

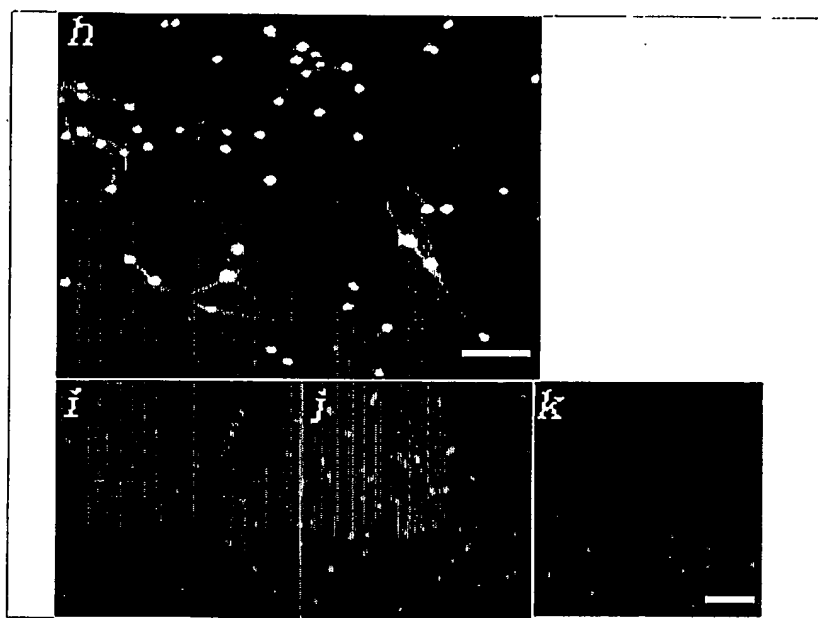
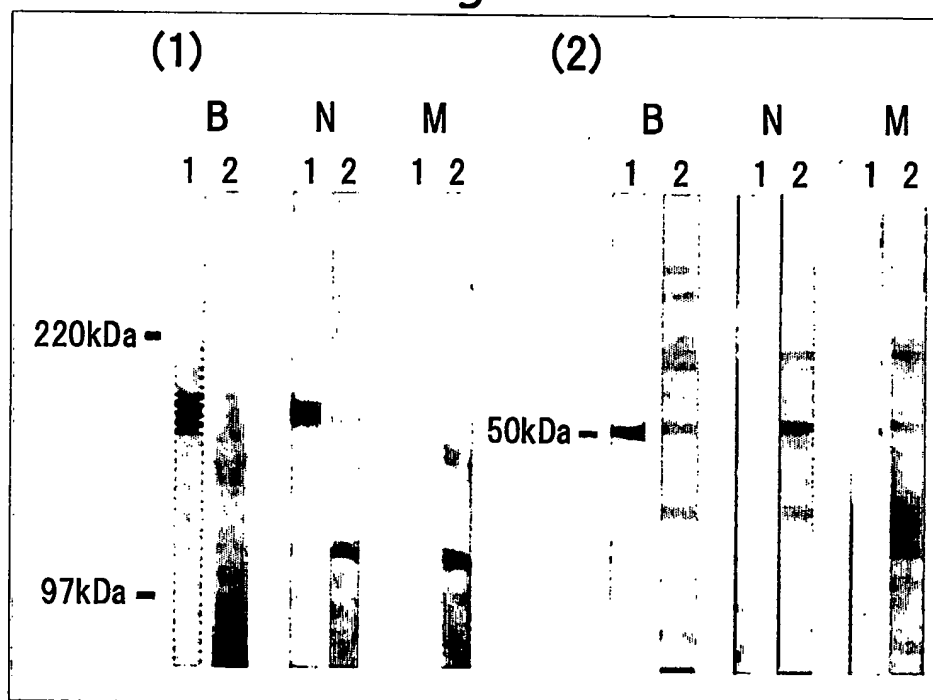


Fig.17i Fig.17j Fig.17k

Fig.17l



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.17m

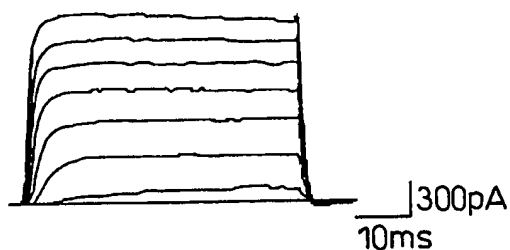


Fig.17n

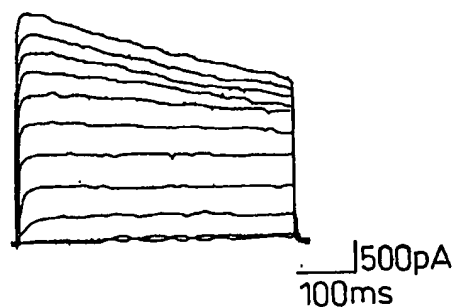


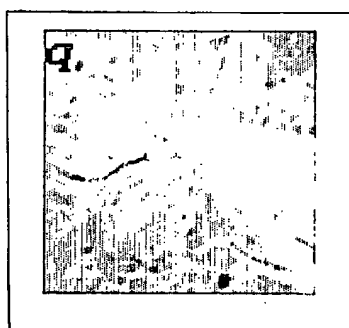
Fig.17o

300pA
10ms

Fig.17p

500pA
100ms

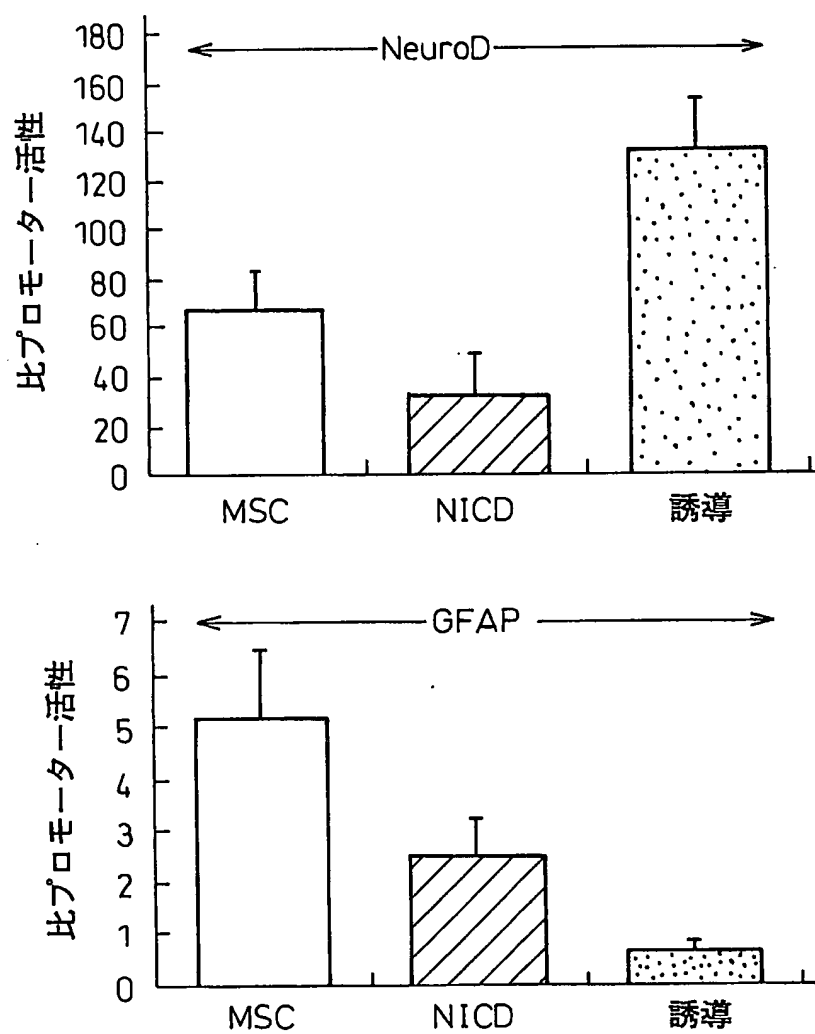
Fig.17q



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

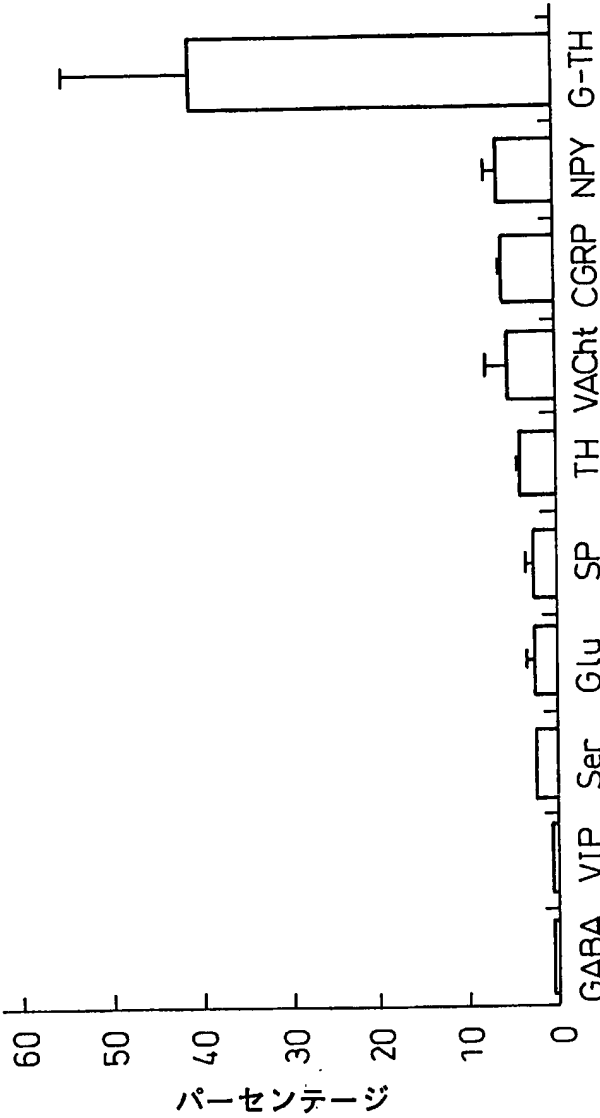
Fig.18



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.19a



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.19b

Fig.19c



Fig.19d

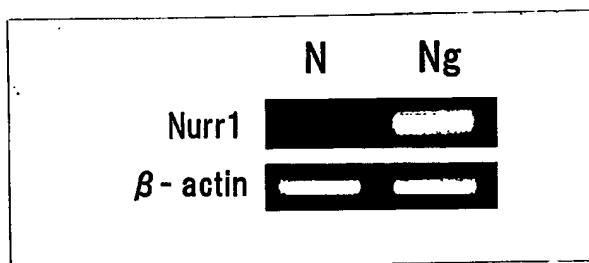
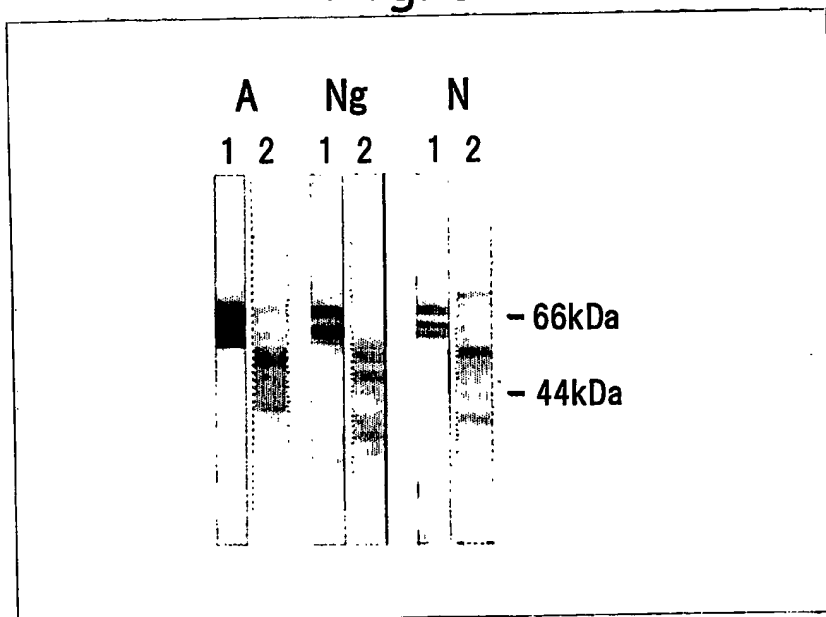


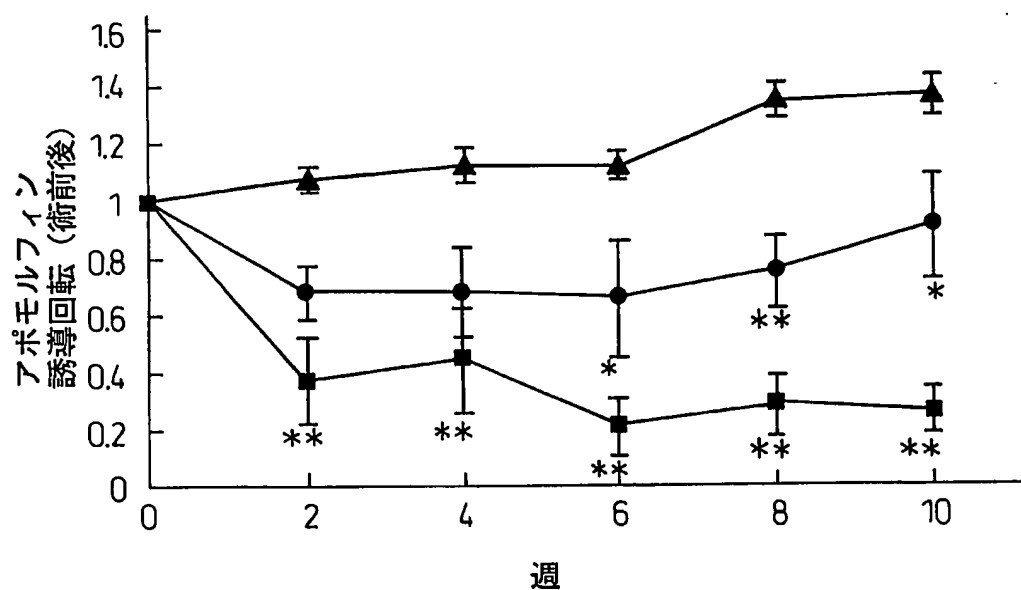
Fig.19e



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.19f



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.19g Fig.19h Fig.19i

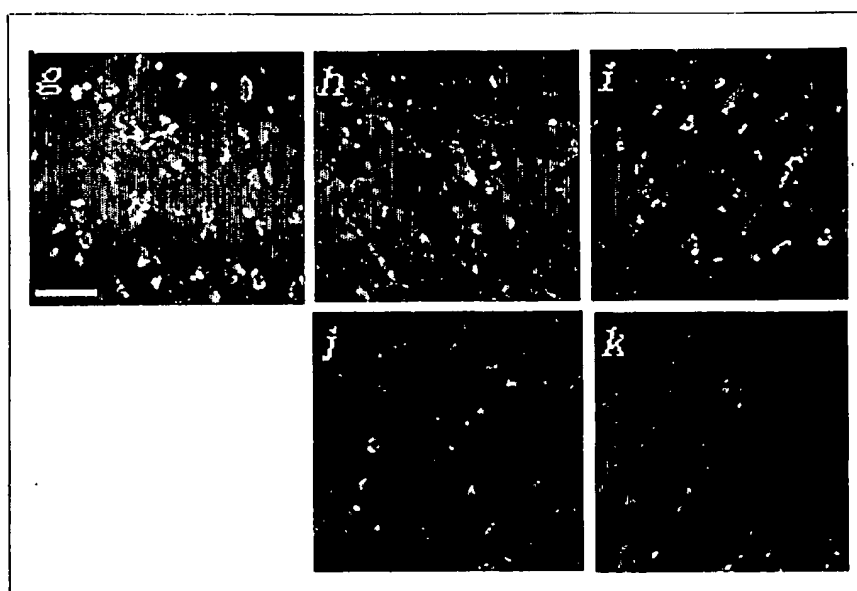


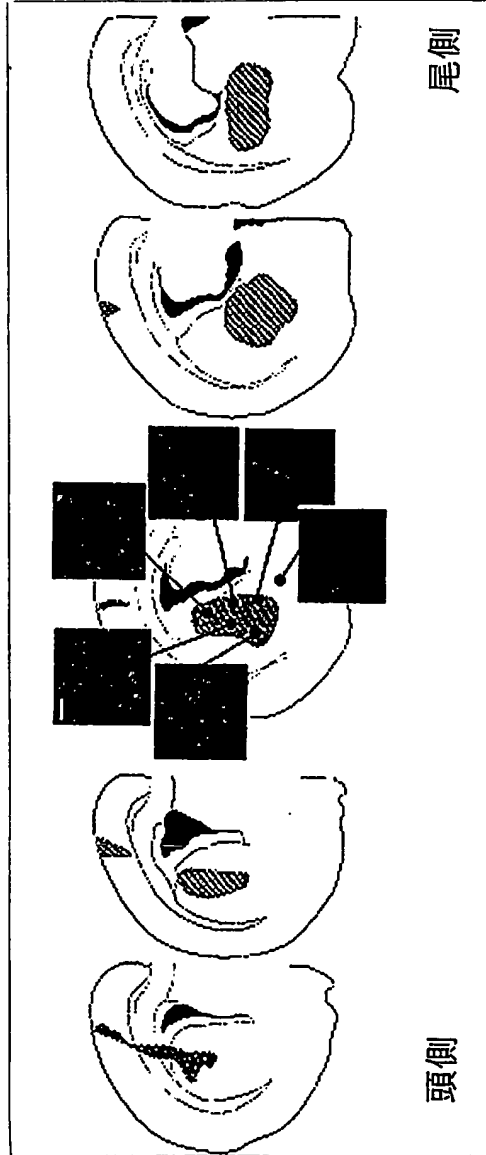
Fig.19j

Fig.19k

WO 03/066856

PCT/JP03/01260

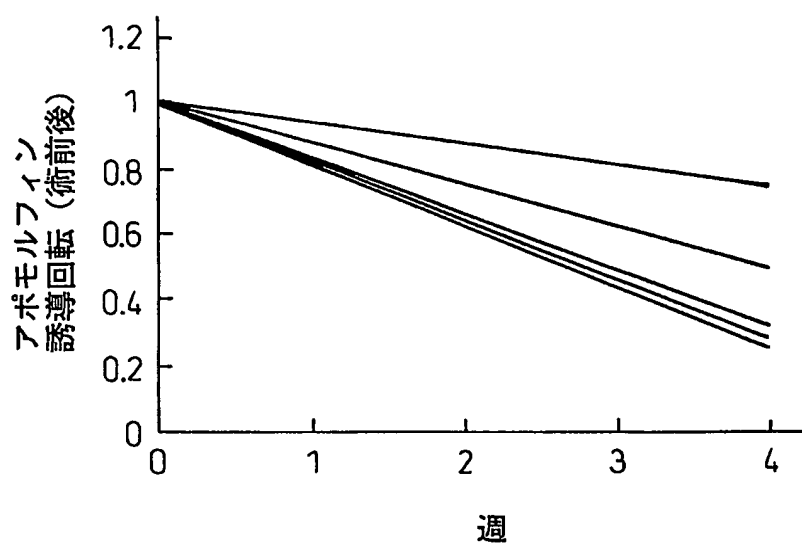
Fig.19l



WO 03/066856

PCT/JP03/01260

Fig.19m



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (SNT), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
JSTPLUS FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | SCHROEDER T. et al., Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation., EMBO J., 2000, Vol.19, No.11, pages 2558 to 2468 | 1-58 |
| A | WO 99/56759 A1 (UNIV SOUTH FLORIDA), 11 November, 1999 (11.11.99), & EP 1096941 A1 & JP 2002-513545 A & US 2002/0146821 A1 | 1-58 |
| A | WO 01/22978 A2 (UNIV MCGILL), 05 April, 2001 (05.04.01), & EP 1221956 A2 | 1-58 |
| A | PAULETTE A. et al., Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells., Journal of Cellular Physiology, 1999, Vol.181, pages 67 to 73 | 1-58 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 April, 2003 (16.04.03)Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01260

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- ☒
- Claims Nos.: 59-77

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 59 to 77 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

- 2.
- ☐
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- ☐
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01260

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet (1)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

| | | | |
|--|---|---|--|
| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JPO3/01260 | |
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/10 | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/10 | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS ファイル (JOIS) | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | |
| 引用文献の カテゴリ* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | |
| A | SCHROEDER T. et al., Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation., EMBO J. 2000, Vol.19, No.11, p.2558-2468 | 1-58 | |
| A | WO 99/56759 A1 (UNIV SOUTH FLORIDA) 1999.11.11 & EP 1096941 A1 & JP 2002-513545 A & US 2002/0146821 A1 | 1-58 | |
| A | WO 01/22978 A2 (UNIV MCGILL) 2001.04.05 & EP 1221956 A2 | 1-58 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | |
| * 引用文献のカテゴリ | | の日の後に公表された文献 | |
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」 同一パテントファミリー文献 | |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | |
| 国際調査を完了した日 16.04.03 | | 国際調査報告の発送日 30.04.03 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 印 4B 3037 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 0 3 / 0 1 2 6 0

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | PAULETTE A. et al., Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells., Journal of Cellular Physiology 1999, Vol.181, p.67-73 | 1-58 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/01260

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 59-77 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
当該請求の範囲に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法に係るものであるから、PCT 17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**